



Etude du rôle de la phospholipase A2 sécrétée de type IIA dans la mucoviscidose : modulation de son expression par *Pseudomonas aeruginosa*

Erwan Pernet

► To cite this version:

Erwan Pernet. Etude du rôle de la phospholipase A2 sécrétée de type IIA dans la mucoviscidose : modulation de son expression par *Pseudomonas aeruginosa*. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066249 . tel-01202341

HAL Id: tel-01202341

<https://theses.hal.science/tel-01202341>

Submitted on 20 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Unité de Défense Innée et Inflammation, Inserm U874, Institut Pasteur

Etude du rôle de la phospholipase A2 sécrétée de type IIA dans la mucoviscidose : modulation de son expression par *Pseudomonas aeruginosa*

Par Erwan Pernet

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par le Dr. Lhousseine Touqui

Présentée et soutenue publiquement le 18 Septembre 2014

Devant un jury composé de :

Pr. Jean-François Bernaudin

Président

Pr. Mario Ollero

Rapporteur

Pr. Marc Chanson

Rapporteur

Dr. Loic Guillot

Examineur

Dr. Mustapha Si-Tahar

Examineur

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier le Docteur Michel Chignard pour m'avoir accueilli dans son unité Défense Innée et Inflammation au sein de l'Institut Pasteur. Merci Michel pour la qualité de l'environnement de travail, de l'ambiance fabuleuse.

Je tiens à montrer toute ma reconnaissance au Professeur Jean-François Bernaudin, pour avoir accepté de présider cette thèse.

Je tiens également à exprimer ma gratitude au Professeur Mario Ollero et au Professeur Marc Chanson, qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je tiens de la même façon à exprimer ma gratitude au Docteur Loic Guillot et au Docteur Mustapha Si-Tahar pour avoir accepté d'être membres de mon jury en qualité d'examineurs. Je tiens plus particulièrement à remercier le Dr. Loic Guillot, pour son implication en tant que tuteur pendant ma thèse et pour m'avoir fait part de son expérience et m'avoir conseillé sur mon choix futur de laboratoire.

Je remercie ensuite mon directeur de thèse, le Docteur Lhoussaine Touqui. Un immense merci à toi Lhoussaine, pour m'avoir choisi comme étudiant. Merci de m'avoir confié ce fantastique projet et pour la confiance que tu m'as accordé, de ta présence permanente et de tous les échanges que nous avons pu avoir. Tu as toujours réussi à me motiver pour que je me dépasse.

Je remercie également mon co-encadrant non officiel, le Docteur Yongzheng Wu. Tu as toujours été là pour parler Science, répondre à mes questions et m'orienter dans les bonnes directions. Tes connaissances techniques, que tu as su me transmettre, ont été une aide inestimable. Un grand merci !

Ô Laurent, Grand sage solitaire des moumous au sommet de la montagne ! Je ne pense pas trouver de mots qui permettront de décrire tout ce que tu as pu m'apporter, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Tu as également été un soutien indéfectible dans les moments et manip compliqués. Je te souhaite le meilleur pour la suite ainsi qu'à Nat. Et on espère vous voir chez les caribous !

A Clément, le petit timide que nous avons dévergondé. Je ne compte plus le nombre de délires et de discussions sans fin que nous avons pu avoir. Une bouffée d'oxygène dans notre labeur quotidien. Les pauses café sur le toit du BIME et les étés à Pasteur me manquent déjà (j'imagine que toi aussi !). Bon vent à toi et à Catherine ! On vous attend à Montreal avec impatience ! On regardera Sharknado 3 ou Jurassic Shark vs Giant Octopus 2 en version québécoise !

MAM (Mathieu), première personne à m'avoir accueilli au laboratoire, tu as su faire du labo un endroit exceptionnel. Tu m'as tout montré, notamment une autre vision de la vie. Je te souhaite de t'épanouir tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel et de continuer à profiter de la vie. Des bécots l'ami !

Mon cher Fab, merci pour ta joie de vivre communicatrice. Merci pour tous les bons moments que nous avons partagé au labo et en dehors. Jamais je n'oublierais Ingrid :D ! J'ai pu suivre ton évolution ces deux dernières années et te voir t'affirmer. Et j'espère que tu trouveras bientôt le bonheur que tu mérites d'avoir. Bon courage pour la suite dans le Nord (de Paris ^^).

Je n'oublie pas Vinciane. Merci pour toutes nos conversations scientifiques ou pas, d'avoir partagé ton expérience. Une vraiment belle rencontre. Je te souhaite tout plein de bonheur, une belle carrière scientifique et tout plein de bonnes choses !

Jeremy, mon premier stagiaire, qui a su me supporter ! Je te souhaite bonne continuation pour la suite !

Enfin, merci à tous ceux qui ont contribué à rendre ces 3 années exceptionnelles : Aurélie (courage Déesse des moumous!), Dom (bon voyage ;) !), Thomas (futur Grand !), Viviane, Fatima, Paolo, Jean-Michel, Brigitte S, sans oublier Florence et Brigitte B, les 3 Guillaume, Julie ! Merci à tous pour ces trois superbes années ! Je vous garde tous dans mon cœur !

Une petite pensée pour Carlos Blanco, un professeur exceptionnel qui a fait naître en moi cette passion pour la Recherche !

Je finis par le meilleur, enfin la meilleure. Merci à toi Roxane, pour tout depuis la première année de Fac. Sans toi et ton soutien je ne serais pas en train d'écrire ces quelques lignes. Je t'aime.

Communications et publications scientifiques.

Publications :

Erwan PERNET, Laurent GUILLEMOT, Pierre-Regis BURGEL, Clemence MARTIN, Dominique LEDUC, Isabelle SERMET-GAUDELUS, Dorota SANDS, Gerard LAMBEAU, Philippe MORAND, Michel CHIGNARD, Yongzheng WU et Lhousseine TOUQUI.

Pseudomonas aeruginosa manipulates host innate immunity to eradicate *Staphylococcus aureus*.

Nature Communications. Accepté.

Erwan PERNET, Jérémy BRUNET, Laurent GUILLEMOT, Michel CHIGNARD, Lhousseine TOUQUI et Yongzheng WU.

S. aureus adenosine inhibits sPLA2-IIA mediated killing in the airways.

Soumis à *Journal of Infectious Diseases*.

Communications orales:

***P. aeruginosa* manipulates host innate immunity to kill another pathogen : role of sPLA2-IIA.**

E. Pernet, L. Guillemot, M. Chignard, Y-Z. Wu and L. Touqui.

Oral presentation. *Research Day of Infection and Epidemiology Department*. 1-2 Oct. 2013. Paris, France.

***P. aeruginosa* manipulates host innate immunity to kill another pathogen : role of sPLA2-IIA.**

E. Pernet, L. Guillemot, M. Chignard, Y-Z. Wu and L. Touqui.

Oral presentation. *Pseudomonas 2013*. 7-11 Sept. 2013. Lausanne, Switzerland.

Mechanisms of *P. aeruginosa*-induced expression of secretory type IIA phospholipase A2 in cystic fibrosis lung epithelial cells.

E. Pernet, L. Guillemot, M. Chignard, Y-Z. Wu and L. Touqui.

Oral presentation. *GREMI 2013*, « *The underestimated role of epithelium in inflammation* ». 12th, April 2013. Paris, France.

Mechanisms of *P. aeruginosa*-induced expression of secretory type IIA phospholipase A2 in cystic fibrosis lung epithelial cells.

E. Pernet, D. LeDuc, M. Chignard, Y-Z. Wu and L. Touqui.

Oral presentation. *4th European workshop on lipid mediators*. 27-28 September 2012. Paris, France.

Prix du meilleur jeune chercheur.

Communications par poster:

***P. aeruginosa* manipulates innate immunity to eliminate *S. aureus*: Role of an host bactericidal protein.**

E. Pernet, L. Guillemot, D. Leduc, M. Chignard, Y-Z. Wu and L. Touqui.

Poster. *European Cystic Fibrosis Society, Basic Science*. 26-31 March. 2014. St Julians, Malta.

Prix du meilleur poster.

Mechanisms of *P. aeruginosa*-induced expression of secretory type IIA phospholipase A2 in cystic fibrosis lung epithelial cells.

E. Pernet, L. Guillemot, M. Chignard, Y-Z. Wu and L. Touqui.

Poster. *ATS 2013*. 17-22 May 2013. Philadelphia, USA.

Mechanisms of *P. aeruginosa*-induced expression of secretory type IIA phospholipase A2 in cystic fibrosis lung epithelial cells.

E. Pernet, D. LeDuc, M. Chignard, Y-Z. Wu and L. Touqui.

Poster. *Journées de la Recherche Respiratoire*. 19-20 October 2013. Lille, France.

Mechanisms of *P. aeruginosa*-induced expression of secretory type IIA phospholipase A2 in cystic fibrosis lung epithelial cells.

E. Pernet, D. LeDuc, M. Chignard, Y-Z. Wu and L. Touqui.

Poster. *13rd Colloque des Jeunes Chercheurs, Vaincre la Mucoviscidose*. 24 April 2012. Paris, France.

Abréviations

ADN : Acide Desoxyribonucleique
ADP : Adenosine diphosphosphate
ADPRT : ADP Ribosyltransferase
AMP : Adenosine monophosphate
AMPc : Adenosine monophosphate cyclique
AP-1 : *Activating Protein 1*
ARN : Acide Ribonucleique
ATP : Adenosine triphosphate
CARD : *Caspase-Recruitment Domain*
CD14 : *Cluster Differentiation 14*
CFTR : *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*
CLR : *C-type Lectine Receptor*
ERK : *Extracellular Regulated Kinase*
ExoS/T/Y/U/A : Exotoxine S/T/Y/U/A
GAP : *GTPase Activating Protein*
GTP : Guanosine Triphosphate
HSL : N-acyl-homosérines lactones
IKK : *IκB Kinases*
IL8 : Interleukine 8
IRAK : *IL-1 Receptor Associated Kinase*
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
LBP : *LPS-Binding Protein*
LPS : Lipopolysaccharide
LRR : *Leucin Rich Repeat domain*
MA : Macrophages Alvéolaires
MALP-2 : *Macrophage-Activating Lipopeptide-2*
MAPK : *Mitogen Associated Protein Kinase*
MDP : Muramyl dipeptide
MDPc : Muramyl dipeptide contrôle
MyD88 : *Myeloid Differentiation primary response gene 88*
NF-κB : *Nuclear Factor-κB*
NLR : *NOD-Like Receptor*

NOD : *Nucleotide-binding oligomerization domain*

Pam3CSK4 : Pam3CysSerLys4, lipoprotéine bactérienne

PAMP : *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PRR : *Pathogen Recognition Receptors*

RIG : *Retinoic acid-Inducible Gene 1*

RIP2 : *Receptor Interacting Protein 2*

RLR : *RIG-Like Receptor*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

SST2/3 : *Système de Sécrétion de Type 2/3*

TLR : *Toll-Like Receptor*

TRAF : *Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor*

TRAM : *TRIF-Related Adaptor Molecule*

TRIF : *TIR-containing adaptor inducing interferon-Beta*

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	10
I. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	10
A. GENERALITES.....	10
B. FACTEURS DE VIRULENCE.....	11
1. <i>Facteurs de virulence membranaires.</i>	11
2. <i>Facteurs de virulence sécrétés.</i>	15
C. SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III.....	19
1. <i>L'injectisome.</i>	19
2. <i>Appareil de translocation.</i>	20
3. <i>Régulation de l'expression du T3SS.</i>	21
4. <i>Effecteurs</i>	21
D. INFECTIONS A PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	25
E. BIOFILM.....	26
1. <i>Mécanismes de communication bactérienne, le Quorum sensing.</i>	26
2. <i>Formation du biofilm</i>	28
II. SYSTEME DE DEFENSE INNEE.....	31
A. GENERALITES.....	31
1. <i>Premier rempart.</i>	31
2. <i>La deuxième ligne de défense: la réponse immunitaire.</i>	31
B. IMMUNITE INNEE PULMONAIRE.....	32
1. <i>Anatomie du poumon.</i>	32
2. <i>Cellules de l'immunité innée</i>	32
3. <i>Reconnaissance des pathogènes</i>	35
4. <i>Récepteurs et Pseudomonas aeruginosa.</i>	39
C. MUCOVISCIDOSE.....	41
1. <i>Généralités</i>	41
2. <i>Mucoviscidose et immunité</i>	42
3. <i>Pathogènes bactériens dans les poumons de patients MV.</i>	43
III. PHOSPHOLIPASE A2.....	46
A. DEFINITION.....	46
B. ROLE PHYSIOLOGIQUE DES PLA2.....	46
1. <i>Voie des cyclooxygénases, COX1 et COX2</i>	47
2. <i>Voie des lipoxygénases, LOX</i>	48
3. <i>Récepteurs des médiateurs lipidiques.</i>	48
4. <i>Médiateurs lipidiques dans l'inflammation pulmonaire.</i>	49
C. PHOSPHOLIPASES A2 SECRETEES.....	49
D. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE LA SPLA2-IIA.....	52
E. REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA SPLA2-IIA.....	53
IV. BUT DU TRAVAIL.....	55
RESULTATS.....	56
ARTICLE 1: <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> MANIPULATES HOST INNATE IMMUNITY TO ERADICATE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS.</i>	57
ARTICLE 2: <i>S. AUREUS</i> ADENOSINE INHIBITS SPLA2-IIA-MEDIATED HOST KILLING IN THE AIRWAYS.	119
DISCUSSION GENERALE.....	160
CONCLUSIONS.....	169
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	170

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> .	11
Figure 2: Différence de structure de la membrane entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.	12
Figure 3: Structure du lipopolysaccharide.	13
Figure 4: Flagelle et <i>pilus</i> de <i>P. aeruginosa</i> .	15
Figure 5: Systèmes de sécrétion de <i>P. aeruginosa</i> .	16
Figure 7: Facteurs de virulence contrôlés par le <i>Quorum sensing</i> .	27
Figure 8 : Fonctionnement du <i>Quorum sensing</i> .	28
Figure 9: Etapes de formation du biofilm.	29
Figure 10: Voies de signalisation des récepteurs de type Toll.	37
Figure 11: Prévalence des infections bactériennes dans la mucoviscidose.	44
Figure 12 : Mode d'action des phospholipases A2.	46
Figure 13 : Synthèse des médiateurs lipidiques.	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Prévalence des toxines du système de sécrétion de type 3 dans différents isolats de <i>P. aeruginosa</i> .	22
Tableau 2 : Informations sur les effecteurs du T3SS de <i>P. aeruginosa</i> .	24
Tableau 3 : Prévalence des bactéries dans différentes pathologies infectieuses humaines.	25
Tableau 4 : Les principaux peptides antimicrobiens, leur source et mode d'action.	34
Tableau 5 : Les récepteurs de type Toll et leurs ligands issus de micro-organismes.	36
Tableau 6: Les principaux médiateurs lipidiques produits dans les poumons et leur source.	49
Tableau 7 : Caractéristiques des phospholipases A2 sécrétées.	51

Introduction

I. *Pseudomonas aeruginosa*

A. Généralités

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquiste à Gram négatif, motile grâce à un flagelle monotriche polaire, retrouvée dans les environnements humides. Son génome de 6,3 millions de paires de bases (souche de référence PAO1) est plus grand que celui d'autres bactéries, comme *Escherichia coli* (4,6 Mpb) ou encore *Staphylococcus aureus* (2,6 Mpb). Le génome de la souche PAO1 a été entièrement séquencé en 2000, indiquant qu'en plus d'un génome conservé (*core*), il possède de nombreuses zones variables [1]. En effet, des études génomiques sur des souches cliniques, environnementales ou de laboratoire comparées à la souche de référence PAO1, ont permis de montrer une très grande variabilité génétique au sein de *P. aeruginosa*. Au moins 10% du génome des souches cliniques/environnementales ou de laboratoire est unique par rapport à celui de la souche PAO1, dû en parti à l'acquisition de nombreux gènes par transfert horizontal [2, 3]. De cette façon, le génome de *P. aeruginosa* est en constante évolution, lui permettant de s'adapter à chaque environnement, notamment en présence de l'hôte ou en présence d'agents antimicrobiens.

P. aeruginosa possède de nombreux gènes impliqués dans le catabolisme et les systèmes d'efflux des antibiotiques, lui permettant de résister à de nombreux antibiotiques utilisés en clinique [4, 5]. La résistance aux antibiotiques est plus élevée pour les isolats provenant de patients souffrant de mucoviscidose [5]. Les différents mécanismes mis en place sont ceux retrouvés pour d'autres bactéries: les systèmes d'efflux ou le manque de perméabilité, l'inactivation et la modification des antibiotiques et la modification des cibles de ces derniers [5]. La formation de biofilm lui confère également une résistance aux antibiotiques et le rend ainsi plus difficile à traiter, notamment dans la mucoviscidose [6].

P. aeruginosa est un pathogène pour de nombreux organismes eucaryotes, comme les plantes, les insectes ou les vertébrés. Pour l'Homme, *P. aeruginosa* est considéré comme opportuniste, c'est à dire qu'il n'est pas pathogène pour l'organisme en temps normal, mais qui le devient lorsque les défenses de l'hôte sont affaiblies. Il est responsable d'infections nosocomiales et d'infections communautaires. Le bacille est acquis soit par auto-contamination (contamination endogène provenant de la sphère oro-pharyngée), soit par

transmission (équipements contaminés, manutention). *P. aeruginosa* est responsable d'infections respiratoires chroniques chez des individus immunodéprimés (VIH, chimiothérapie) et représente la première cause de mortalité chez les individus atteints de la mucoviscidose [7]. Il possède une large gamme de facteurs de virulence, lui permettant de coloniser et de persister dans ses différents hôtes.

B. Facteurs de virulence

P. aeruginosa possède tout un arsenal de facteurs de virulence impliqués dans sa pathogénicité. Ces derniers peuvent être classés en facteurs membranaires ou sécrétés (Figure 1) [8].

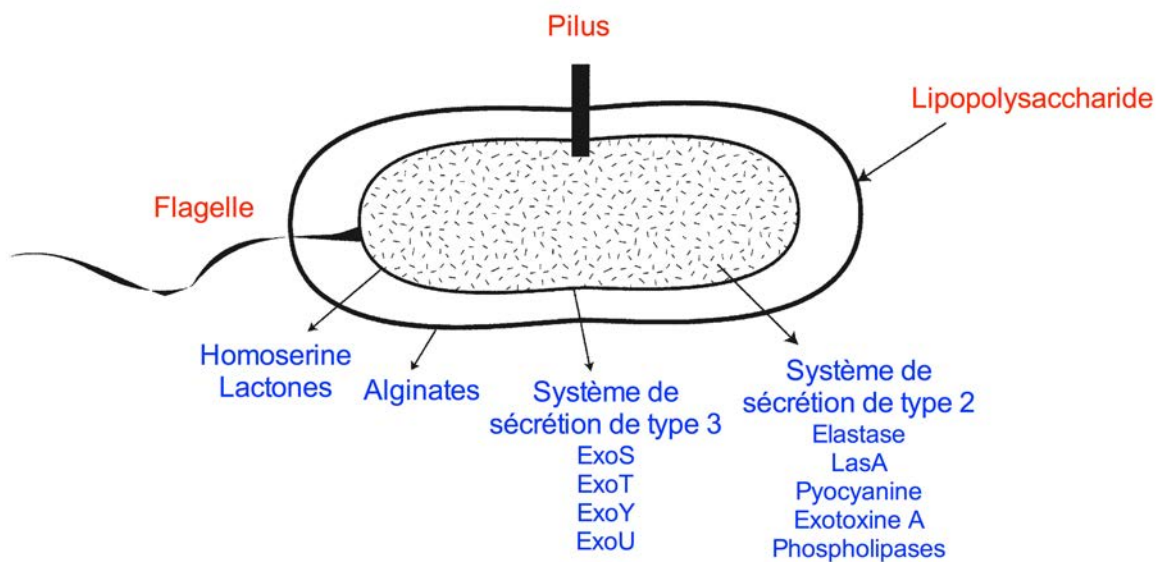


Figure 1 : Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.

En rouge les facteurs de virulence membranaires. En bleu les facteurs de virulence sécrétés. Adapté de [8].

Les facteurs de virulence regroupent aussi bien les toxines, dont le but est d'endommager l'hôte, que les molécules reconnues par le système immunitaire, aussi connus sous le nom de PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*).

1. Facteurs de virulence membranaires.

a. Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont retrouvés chez toutes les bactéries à Gram négatif, qui, contrairement aux bactéries à Gram positif (Figure 2a), possèdent une membrane externe, sur laquelle se trouve les LPS (Figure 2b).

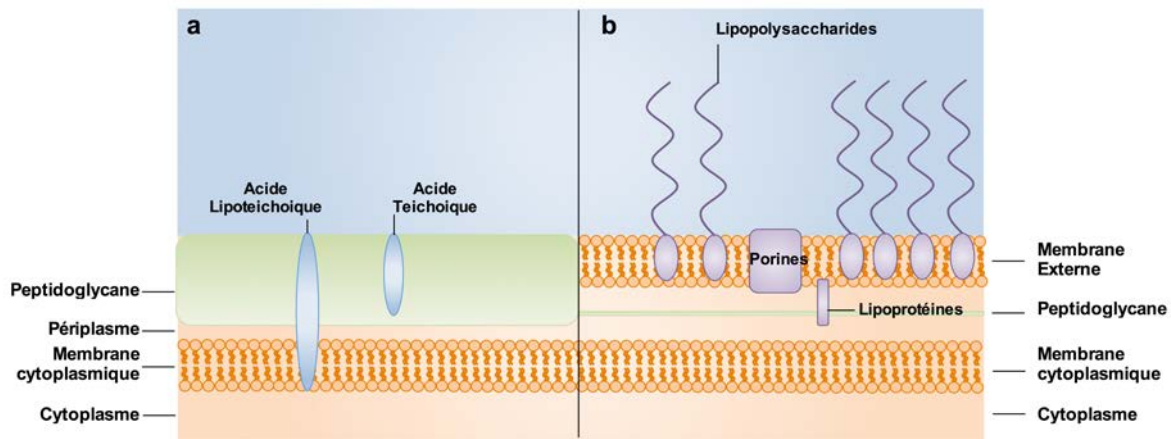


Figure 2: Différence de structure de la membrane entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

(a) Les bactéries à Gram positif ont une membrane cytoplasmique, un périplasma restreint et une épaisse paroi de peptidoglycane. Les acides lipoteichoïques sont ancrés dans la membrane cytoplasmique et sont reliés au peptidoglycane. (b). Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane cytoplasmique, un périplasma plus important avec une fine couche de peptidoglycane, et une membrane externe sur laquelle sont greffés les lipopolysaccharides et où se trouvent des porines facilitant le passage de molécules. Des lipoprotéines relient le peptidoglycane à la membrane externe. Adapté de [9].

Le LPS est composé de 3 domaines différents: le lipide A, le noyau (*core*) et enfin la partie polysaccharidiques [10] (Figure 3). Le lipide A, région hydrophobe du LPS, permet l'ancrage à la membrane externe. Le noyau est une partie oligosaccharidique sur laquelle est rattachée la chaîne polysaccharidiques O spécifique, ou antigène O, dépassant de la membrane externe. Cette chaîne O, qui peut être absente, varie avec les espèces de bactéries en composition saccharidiques ou en nombre de répétitions du motif polysaccharidique. Lorsque la chaîne O est absente il est alors question de phénotype rugueux et quand elle est présente, il est question de phénotype lisse. Les isolats cliniques de patients chroniquement infectés par *P. aeruginosa* présentent généralement un phénotype rugueux [11].

Le lipide A est composé de deux glucosamines biphosphorylés, N- et O-acylatés et reliés par une liaison bêta 1-6. Les acides gras, dont la structure varie selon les souches, sont fixés sur les glucosamines en position 2' et 3'. La plupart des souches utilisées en laboratoire possèdent cinq groupements acyl sur le lipide A (penta acylation) [10]. Dans les isolats provenant de patients chroniquement infectés par *P. aeruginosa*, la forme hexa acylatée est plus

fréquemment retrouvée, constituant une des modifications du LPS des souches chroniques [11].

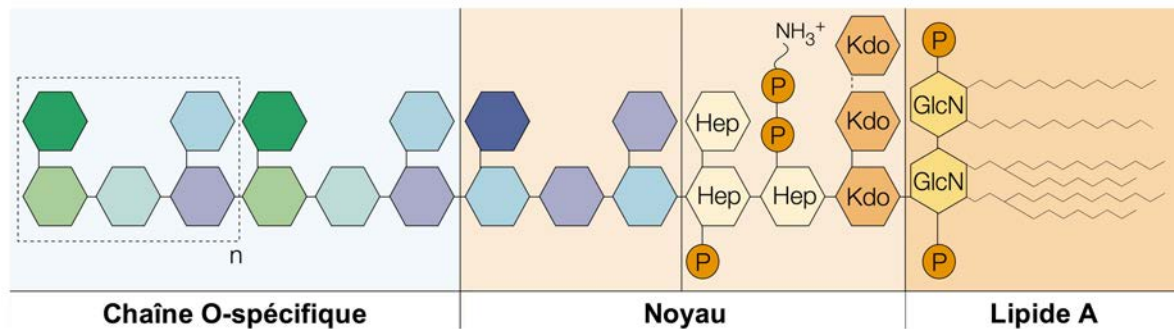


Figure 3: Structure du lipopolysaccharide.

Le LPS est composé de 3 domaines différents: le lipide A, le noyau (core) et enfin la partie polysaccharidique. Le lipide A, région hydrophobe du LPS, permet l'ancrage à la membrane externe. Le noyau est une partie oligosaccharidique sur lequel est rattaché la chaîne polysaccharidique O spécifique, ou antigène O, dépassant de la membrane externe. Adapté de [12].

Le lipide A est la partie la plus importante du LPS, car il ne peut pas être délété [10]. C'est également le ligand du TLR4, un récepteur membranaire de l'hôte impliqué dans la reconnaissance des pathogènes (voir Chapitre II). Le noyau est greffé sur le lipide A et est relativement conservé [10]. Il est constitué d'un domaine interne et d'un domaine externe. La partie interne du noyau contient deux résidus d'acide D-manno-oct-2-ulonique, Kdo^I et Kdo^{II} , et de deux résidus heptoses, Hep^I et Hep^{II} [10]. Le noyau externe, possédant deux isoformes (ou glycoformes) au sein d'une même souche, est constitué d'un galactosamine N-alanylaté, de trois résidus D-glucose et d'un résidu L-rhamnose [10]. C'est la position du résidu rhamnose qui différencie la glycoforme 1 de la glycoforme 2. C'est sur la glycoforme 2 qu'est greffée la chaîne O polysaccharidique [10]. La chaîne O polysaccharidique permet de définir le sérotype de *P. aeruginosa* auquel appartient la souche [11]. La chaîne O est constituée de motifs polysaccharidiques répétés, dont le nombre et la structure varient en fonction du sérotype [13].

b. Flagelline

P. aeruginosa produit un flagelle monotriche polaire, assurant la chimiotaxie et la mobilité à la bactérie et contribuant à sa virulence [14]. La structure du flagelle de *P. aeruginosa* est très proche de celle des entérobactéries comme *Salmonella* et *E. coli*. La structure globale du flagelle comporte trois parties principales: le corps basal, le filament et le crochet de torsion [15] (Figure 4a). Le corps basal consiste en un complexe protéique qui traverse la membrane.

Il est composé d'un complexe protéique cytoplasmique (*C-ring*), d'un anneau ancré dans la membrane interne (*MS-ring*), d'un canal traversant l'espace périplasmique, d'un anneau ancré dans le peptidoglycane (*P-ring*) et un anneau dans la membrane externe (*L-ring*) [15]. Le corps basal fonctionne avec le complexe MotAB qui permet de fournir de l'énergie au système afin d'obtenir la rotation du flagelle dans le sens contraire des aiguilles d'une montre [16]. Le crochet est une structure cylindrique assurant le rôle de connecteur entre le corps basal et le filament. Le filament est composé des sous-unités de flagelline, FliC, et d'une protéine Cap, FliD, favorisant la polymérisation [15]. Le flagelle est indispensable à *P. aeruginosa* pour établir une infection et persister chez l'hôte [17], mais aussi pour établir un biofilm [14]. L'expression du flagelle de *P. aeruginosa* est perdue lors du passage du mode de vie planctonique au mode de vie biofilm (mode de vie des souches chroniques dans la mucoviscidose) [18].

c. Pili

P. aeruginosa produit des pili polaires, les pili de type IV [19, 20]. La structure des pili de *P. aeruginosa* varie selon les souches [21, 22]. Ce sont des structures d'environ 6nm de diamètre, qui peuvent s'étendre sur plusieurs mm de long. Ils sont constitués d'un assemblage de la piline PilA, ancrée dans la membrane interne et externe par les protéines PilC et PilQ respectivement (Figure 4b) [20]. Le complexe PilC/B/T fournit l'énergie au système, permettant la contraction et l'étirement du pilus [19, 20].

Les pilis sont impliqués dans l'attachement aux surfaces et permettent également à la bactérie de se mouvoir sur une surface par un mécanisme appelé *twitching*, en se rétractant et s'étirant [19]. Les pilis de type IV permettent également l'adhérence aux cellules épithéliales de l'hôte en se fixant sur le récepteur asialo-GM1, ce qui conduit également à l'activation de la réponse immunitaire [23-25]. Une étude récente a montré que le pili de *P. aeruginosa* était également capable d'activer l'inflammasome [26].

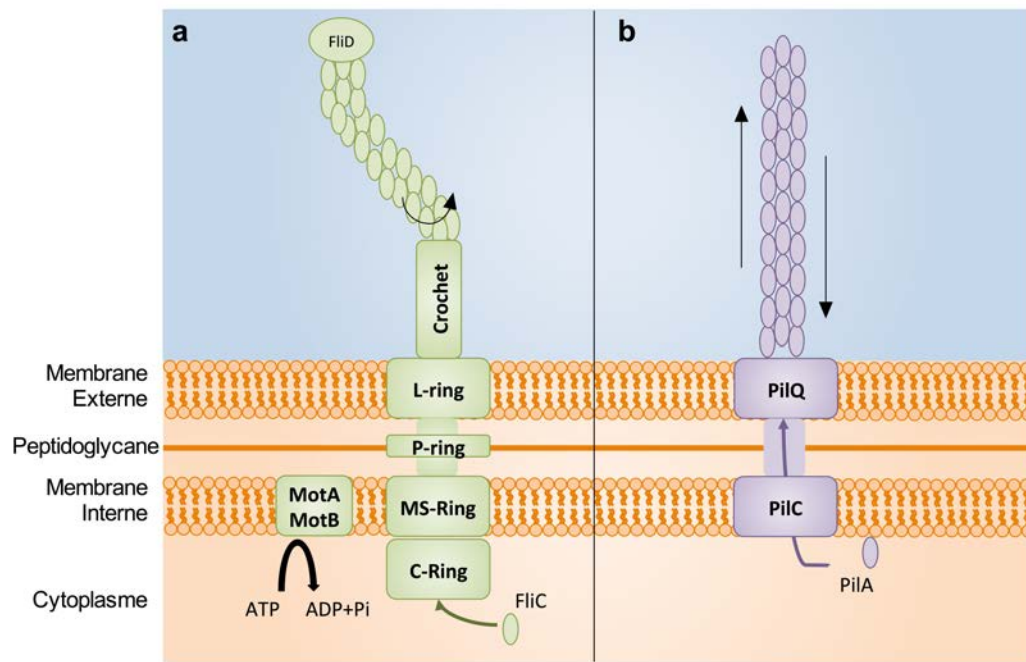


Figure 4: Flagelle et pilus de *P. aeruginosa*.

(a) Le flagelle de *P. aeruginosa* est composé du corps basal, du crochet et du filament. Le corps basal est un complexe protéique organisé en quatre sous unités, les anneaux C, MS, P et L. Le crochet permet de relier le corps basal au filament. Ce dernier est composé de la flagelline FliC et se termine par la protéine FliD. L'énergie nécessaire au système est fournie par le complexe MotAB. (b) Le pilus de *P. aeruginosa*, pili de type IV, est composé de la sous unité PilA. Il permet à la bactérie de se déplacer sur une surface en s'étirant et en se rétractant. Adapté de [15, 20].

2. Facteurs de virulence sécrétés

P. aeruginosa possède 6 systèmes de sécrétion (Figure 5), mais seulement 2 semblent réellement impliqués dans sa pathogénie: le système de sécrétion de type 2 (T2SS) codé par les gènes *xcp* [27] et le système de sécrétion de type 3 (T3SS) codé par les gènes *psc* [28]. Le T2SS permet la sécrétion de multiples facteurs de virulence dans le milieu extracellulaire (élastases LasB, LasA, phospholipase, etc.), alors que le T3SS permet l'injection de toxines directement dans la cellule hôte.

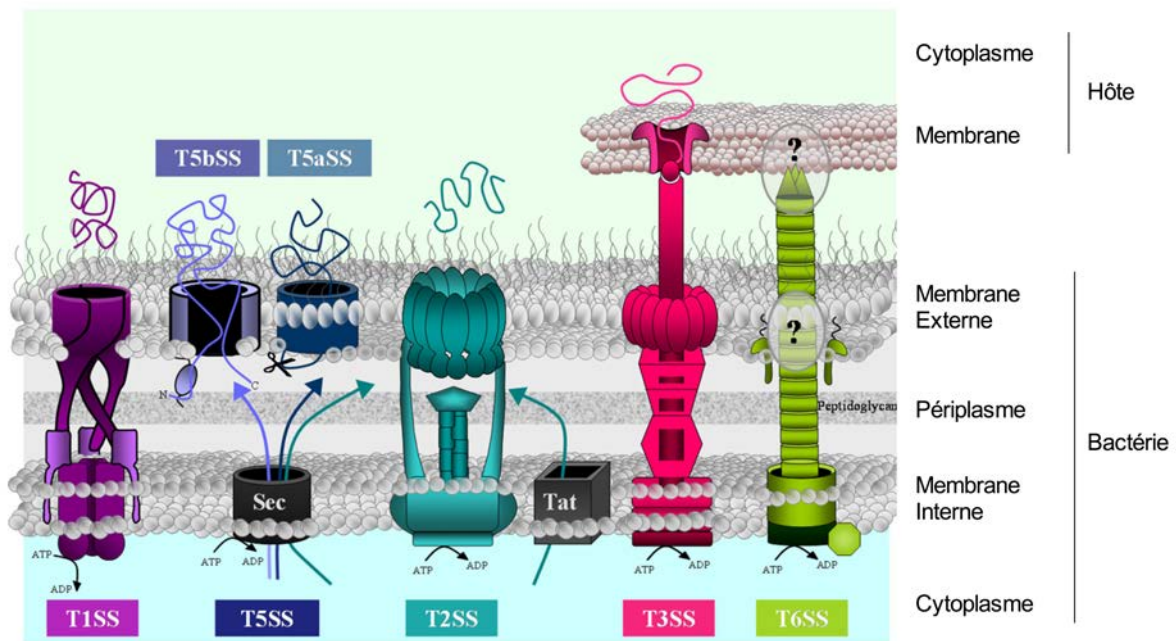


Figure 5: Systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa possède 6 systèmes de sécrétion qui permettent de relarguer des protéines dans le milieu extracellulaire (T1SS, T2SS, T5aSS, T5bSS) ou directement dans une cellule cible (T3SS et T6SS). Les T2SS et T3SS sont les systèmes de sécrétion les plus importants dans la pathogénie de *P. aeruginosa*. Adapté de [29].

a. Alginates

Les alginates sont des copolymères linéaires d'acides D-mannuronique et L-guluronique reliés par des ponts β -1,4. L'opéron *alg* est constitué de 12 gènes, dont le premier, *algD*, codant pour une GDP-Mannose 6 déshydrogénase, est surexprimé chez les souches mucoïdes, alors que son ARNm est non détectable chez les souches non mucoïdes [30]. L'opéron *alg* est transcrit essentiellement grâce au facteur sigma à fonction extracytoplasmique AlgU (ou AlgT), directement ou indirectement, dont l'activité est inhibée par la protéine membranaire MucA [31]. L'hypersécrétion d'alginates est responsable du phénotype mucoïde, retrouvé lors des infections chroniques des patients atteints de mucoviscidose [7, 32]. La surproduction d'alginates par les souches mucoïdes permet d'obtenir un phénotype plus avantageux dans la persistance au niveau de l'épithélium pulmonaire [6] et permet également de diminuer la phagocytose des bactéries et d'indirectement augmenter l'inflammation pulmonaire [33].

b. ADN

L'ADN extracellulaire (ADNe) est le composant majoritaire de la matrice des biofilms de *P.*

aeruginosa [34, 35]. La forte similarité entre l'ADN extracellulaire présent dans la matrice et l'ADN chromosomique de *P. aeruginosa* suggère que l'ADNe provient de la lyse d'une partie de la population bactérienne [35]. Une étude tend à montrer que ce phénomène serait induit par le PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) une molécule du *quorum sensing* [35]. L'ADNe agit comme lien entre les bactéries au sein du biofilm et permet le maintien de son architecture [34]. Il a également été mis en évidence un lien entre l'ADNe et la résistance aux antibiotiques aminoglycosides et aux peptides antimicrobiens [36]. En plus de son rôle dans la structure des biofilms, l'ADN bactérien contribue à l'inflammation [37]. Notamment, l'ADN de *P. aeruginosa* est reconnu par le TLR9 [38].

c. Molécules du Quorum Sensing

P. aeruginosa produit deux types de molécules de signalisation : les N-acyl-homosérines lactones (HSL) et le PQS [39]. Les HSL sont les 3-oxodecanoyl-HSL (C12-HSL) et des N-butyryl-HSL (C4-HSL). Ces molécules sont surtout impliquées dans la formation de biofilm. Les C12-HSL induisent cependant une réponse pro-inflammatoire sur les cellules épithéliales, mais le mécanisme reste encore inconnu [40].

d. Pyocyanine

La pyocyanine est un pigment sécrété, par le système de sécrétion de type 2 (T2SS), qui confère la coloration bleu-vert aux colonies bactériennes, qui a valu à *P. aeruginosa* le nom de bacille pyocyanique. Les mutants déficients en production de pyocyanine sont moins virulents *in vivo* [41]. La pyocyanine est grandement impliquée dans la pathogénie de *P. aeruginosa*. Elle est pro-inflammatoire [42, 43], inhibe le battement ciliaire et la signalisation cellulaire [44] et enfin induit l'apoptose des cellules de l'hôte [41].

e. Elastase

P. aeruginosa sécrète, via le T2SS, l'élastase LasB. LasB est une métalloprotéinase (dépendante du zinc) de 33 kDa. C'est la protéase la plus sécrétée par *P. aeruginosa* [45]. LasB est impliquée dans la dégradation de nombreuses molécules de l'hôte : immunoglobulines, les cytokines et les protéines du surfactant [46]. LasB joue également un rôle dans la répression de la production des toxines du système de sécrétion de type 3, diminuant ainsi l'endocytose des bactéries [47]. En effet, la délétion du gène *lasB* conduit à

une augmentation de la sécrétion de la toxine ExoS. Enfin, une étude récente a montré que LasB détruit les jonctions serrées entre les cellules endothéliales en clivant la V-cadhérine, permettant ainsi l'invasion des tissus par *P. aeruginosa* [48].

f. Staphylolysine LasA

LasA est une protéase de 20 kDa, pour laquelle il a été suggéré qu'elle jouerait un rôle important dans les infections oculaires [49], mais ces résultats restent controversés [50]. Sa fonction la plus connue est d'induire la lyse de *S. aureus*, à la fois *in vitro* et dans un modèle d'infection oculaire *in vivo* [51, 52]. LasA agit sur le peptidoglycane de *S. aureus* en clivant les ponts polyglycines [53, 54].

g. Exotoxine A

L'exotoxine A (ExoA) est une ADP-ribosyltransférase sécrétée dans le milieu extracellulaire [55]. Elle entre dans les cellules par endocytose en se fixant sur son récepteur. Une fois à l'intérieur des cellules, ExoA ADP-ribosyle le facteur d'élongation EF2, inhibant la synthèse protéique et induisant la mort cellulaire [56].

h. Autres facteurs

P. aeruginosa sécrète d'autres molécules qui affectent les cellules de l'hôte. La phospholipase C qui a pour cible la phosphatidylcholine présente dans les membranes eucaryotes [57], participant aux infections pulmonaires aiguës, à l'inflammation et dégradant les protéines du surfactant [58, 59]. Les rhamnolipides sont des biosurfactants sécrétés qui induisent la dégradation de la barrière épithéliale permettant l'invasion bactérienne [60]. La leucocidine constitue également un facteur de virulence qui induit la lyse des granulocytes et lymphocytes [61]. Et enfin la protéine OprF a également été décrite comme importante dans l'infection à *P. aeruginosa* [62].

g. T3SS

Le système de sécrétion de type III permet l'injection de toxines directement dans la cellule hôte.

C. Système de sécrétion de type III

C'est un système hautement spécialisé de sécrétion de protéines, essentiel pour la pathogénie des bactéries pathogènes à Gram négatif, comme *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* [63]. Ce système permet l'injection de protéines dites effectrices (ou toxines) directement dans le cytoplasme de la cellule cible. La plupart des molécules injectées miment des facteurs eucaryotes et sont capables de détourner la «machinerie» de l'hôte en faveur du pathogène lors de l'infection. Elles peuvent notamment induire l'invagination de la membrane permettant l'invasion intracellulaire des cellules non phagocytaires ou la modulation de la réponse immunitaire [63].

Chez *P. aeruginosa*, quarante deux acteurs sont, au minimum, impliqués dans l'expression, la régulation et la sécrétion des toxines par le T3SS [64]. Les différents acteurs peuvent être subdivisés en 5 classes distinctes: i) les protéines constituant la seringue permettant le transport des effecteurs du cytoplasme bactérien au cytoplasme de la cellule hôte, ii) les protéines impliqués dans la translocation en formant un pore dans la membrane de la cellule hôte, iii) les protéines chaperonnes qui facilitent la sécrétion des effecteurs, iv) les régulateurs de l'expression du système et enfin v) les effecteurs eux-mêmes (Figure 6).

1. L'injectisome

L'injectisome permet le passage des effecteurs du cytoplasme bactérien au cytoplasme de l'hôte. Comme pour les modèles très étudiés (*Salmonella*, *Shigella* ou *Yersinia*), l'injectisome de *P. aeruginosa* est composé d'un corps basal et de la seringue (Figure 6).

Le corps basal du T3SS est très proche structuellement du corps basal du flagelle. La seringue est un assemblage de la sous-unité PscF, formant une structure cylindrique à travers laquelle passent les effecteurs. L'énergie nécessaire au transport des effecteurs est fournie en hydrolysant l'ATP via la protéine PscN, elle-même régulée par PscL [65-67]. Les protéines PscC et PscW sont impliquées dans la formation du canal à travers la membrane bactérienne [68, 69]. Les protéines PscP et PscJ semblent jouer le rôle de contrôleurs de la synthèse de la seringue [70, 71].

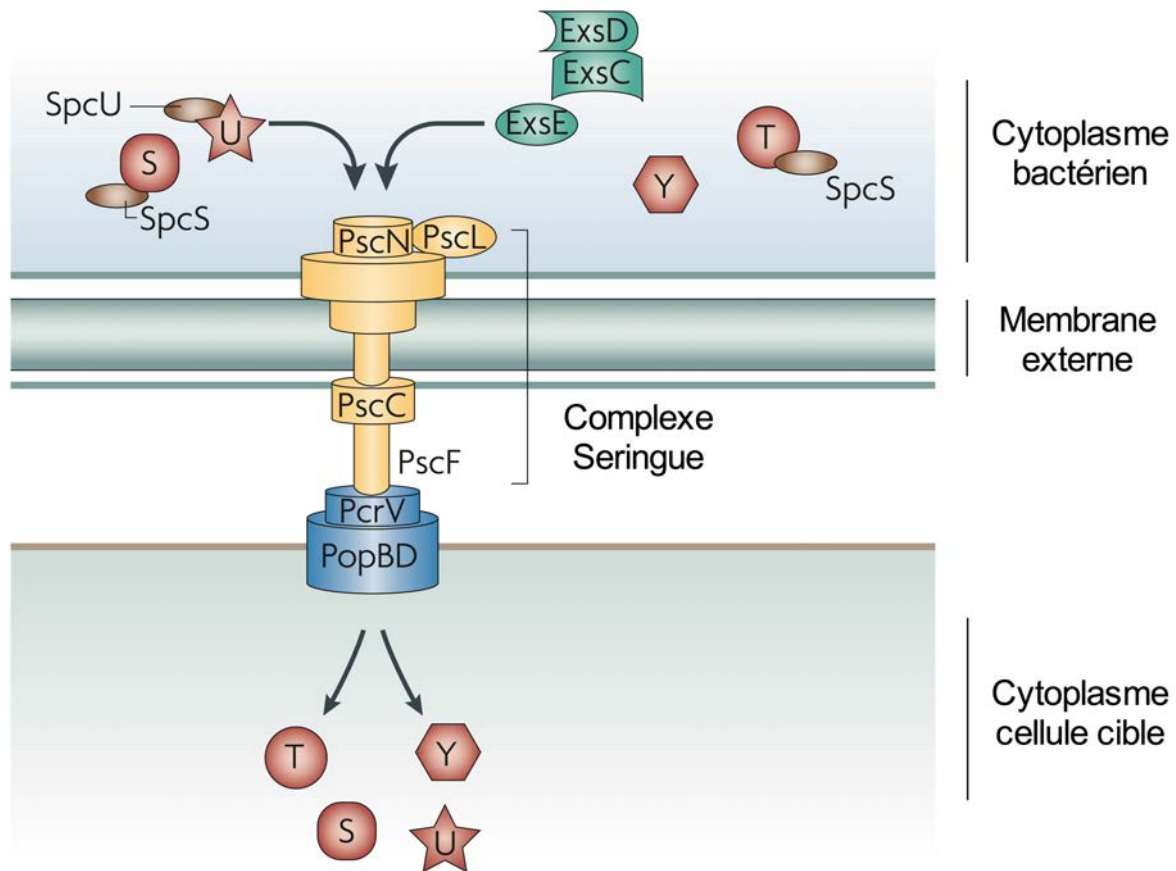


Figure 6: Système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*.

Le système de sécrétion de type 3 permet d'injecter des effecteurs bactériens, ou toxines, directement dans le cytoplasme de la cellule cible. Chez *P. aeruginosa*, quatre effecteurs ont été identifiés, ExoS, ExoT, ExoY et ExoU. Ils sont injectés à travers la seringue composée de sous unités PscF et l'appareil de translocation PopBD/PcrV qui permet de créer le pore dans la membrane de la cellule cible. Adapté de [64].

2. Appareil de translocation

P. aeruginosa exprime 3 protéines impliquées dans la translocation des effecteurs: PopB, PopD et PcrV [72] (Figure 6). Ces protéines sont sécrétées par le T3SS et forment un pore de 2,8 à 6nm dans la membrane de la cellule eucaryote. Indépendamment des toxines, la formation du pore à elle seule induit la mort cellulaire et permet l'activation de l'inflammasome [72]. Il a également été démontré que la flagelline pouvait passer à travers la seringue pour activer l'inflammasome *via* NLRC4 [73, 74].

Les protéines sécrétées sont guidées par les protéines chaperonnes du cytoplasme à l'appareil de sécrétion. Cependant toutes les protéines sécrétées n'ont pas de chaperonnes. Par exemple, SpcS est la chaperonne des exotoxines ExoS et ExoT [75, 76]. SpcU est la chaperonne d'ExoU [77]. Mais ExoY n'en possède pas.

3. Régulation de l'expression du T3SS

La régulation du T3SS de *P. aeruginosa* a lieu au niveau transcriptionnel et au niveau de la sécrétion. L'expression du T3SS est induite par contact avec la membrane de la cellule hôte, mais le récepteur bactérien de ce signal reste encore à définir.

Au niveau transcriptionnel, les protéines de la famille Exs exercent le rôle de régulateur. ExsA est le principal régulateur transcriptionnel de l'expression des gènes du T3SS [78]. A l'état basal, ExsA est complexé à ExsD, inhibant son activité transcriptionnelle. ExsD peut être dégradé par liaison directe avec ExsC [79]. L'activité d'ExsC est elle-même sous contrôle de son inhibiteur ExsE [80]. Ce système finement régulé permet la production contrôlée du T3SS.

D'autres niveaux de régulation sont également impliqués dans l'expression du T3SS, notamment les systèmes à deux composants RetS/LadS et GacA/GacS, les niveaux d'AMP cyclique et les ARN non codants régulateurs RsmA et RsmY [81-83].

Bien qu'il soit bien connu que la sécrétion des effecteurs soit induite par un contact avec la cellule hôte, les mécanismes précis restent encore assez peu connus. Toutefois, le T3SS peut être induit *in vitro* dans un milieu carencé en calcium et enrichi en glutamate [84].

4. Effecteurs

Seulement quatre effecteurs ont été identifiés à ce jour chez *P. aeruginosa*, les exotoxines ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. *P. aeruginosa* produit moins de toxines que les autres bactéries à Gram négatif (*Yersinia* 6 toxines, *Shigella* 25 toxines, *Salmonella* 23 toxines) [62]. L'expression des toxines ExoS et ExoU varie selon la souche et la pathologie (Tableau 1). Ces toxines ne sont pas exprimées dans la même souche [85]. En revanche, les toxines ExoT est toujours exprimée et la toxine ExoY dans la plupart des isolats. ExoU est une phospholipase A2 bactérienne, ExoY une adénylate cyclase et ExoS et ExoT possèdent un domaine GAP (*GTP-Activating Protein*) et un domaine ADPRT (*ADP RibosylTransferase*) (Tableau 2) [84].

Tableau 1: Prévalence des toxines du système de sécrétion de type 3 dans différents isolats de *P. aeruginosa*

Source des isolats	ExoS	ExoU	ExoT	ExoY
Environnement	80%	20%	100%	95%
Infection urinaires	70%	35%	100%	70%
Plaies	60%	40%	100%	93%
Mucoviscidose (expectorations)	85%	10%	100%	90%

Les isolats étudiés ont des profils d'expression des effecteurs du T3SS différents en fonction de leur source d'identification. Les toxines ExoS et ExoU ne sont jamais retrouvées ensemble. La toxine ExoT est présente dans 100% des isolats. Adapté de [84].

a. ExoS

ExoS, tout comme ExoT, est une toxine bifonctionnelle, possédant une activité ADPRT à son extrémité C-terminale et une activité GAP à son domaine N-terminal. ExoS possède également un domaine MLD (*Membrane Localization Domain*) nécessaire pour sa translocation initiale et l'interaction de son domaine ADPRT avec la protéine membranaire de l'hôte Ras [86, 87]. Une fois à l'intérieur de la cellule, ExoS est localisée à la membrane, puis migre vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique [88-90]. Le domaine GAP d'ExoS cible les protéines GTPases Rho, Rac et CDC42 [91]. Ces protéines membranaires passent d'un état actif en étant lié au GTP, à un état inactif, lié au GDP [92]. Le domaine GAP d'ExoS induit le passage de la forme active à la forme inactive [91, 93, 94]. Des études portant sur la structure d'ExoS, complétées par des mutagénèses spécifiques des sites d'intérêt, ont montré que l'inactivation de Rac1 par le domaine GAP était dépendante de l'arginine 146 (R146), inhibant ainsi la signalisation Rac-dépendante [84, 93, 95, 96]. L'interaction de R146 avec Rho, Rac et CDC42, conduisant à la déstabilisation du réseau d'actine, est également impliquée dans l'inhibition de la phagocytose et de l'endocytose [97]. Le domaine ADPRT agit sur des cibles plus nombreuses, mais les deux cibles principales sont la protéine Ras et le complexe Ezrine-Radixine-Moesine (ERM) [98, 99]. L'activité ADPRT d'ExoS nécessite la présence d'un co-facteur eucaryote, les protéines 14-3-3 [98, 100, 101]. Le domaine ADPRT est dépendant de deux glutamines, situées en position 379 et 381 [84]. Ras est une petite protéine membranaire, appartenant à la famille des GTPases, impliquée dans de nombreux processus cellulaires, comme la prolifération des cellules, la survie et le réarrangement de l'actine [102]. L'ADP ribosylation de Ras au niveau de l'arginine 41 par ExoS inhibe la voie de signalisation sous jacente, induisant l'apoptose des cellules infectées [103-105]. Ras-ADP ne peut pas se fixer sur son effecteur Raf1 [106]. Ces résultats sont confortés par l'utilisation

de cellules où Ras et la protéine kinase B, Akt, résistent à l'apoptose induite par ExoS-ADPRT [107]. Les protéines du complexe ERM interagissent directement avec l'actine, modulant la phagocytose et l'adhérence des cellules et sont activées par phosphorylation [108]. C'est sur cette étape de phosphorylation qu'agit ExoS-ADPRT, conduisant à l'inhibition de la phagocytose [99, 109].

De nombreuses études suggèrent qu'ExoS est également capable de moduler le profil d'expression des gènes de la cellule hôte. En effet, ExoS induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes en étant reconnu par le TLR4 et le TLR2 [110, 111]. Des analyses transcriptomiques de cellules épithéliales alvéolaires A549, infectées avec une souche déficiente pour ExoS, montrent des différences dans l'induction de certains gènes, dont des facteurs de transcription [112], peut-être due à l'activation de la MAP kinase JNK et l'inhibition des MAPK p38 et ERK [113]. De la même manière, O'Grady et al. ont démontré que la toxine ExoS, mais pas la toxine ExoT pourtant très proche sur le plan structural d'ExoS, induit l'expression des facteurs de transcription Krüppel-like facteur 2 (KLF2) et KLF6 [114]. KLF2 est un facteur anti-inflammatoire [115, 116] qui agit en inhibant de l'activité de NF- κ B [117, 118]. De cette manière, *P. aeruginosa* détourne la réponse immunitaire pour favoriser sa persistance [114]. L'induction de l'expression de KLF2 par les toxines de *Yersinia* et de *Clostridium* résulte de l'inhibition de RhoA [119], mais les voies de signalisation impliquées pour *P. aeruginosa* restent encore mal connues.

b. ExoT

ExoT est une toxine bifonctionnelle, possédant, comme ExoS, un domaine GAP en N-terminal et un domaine ADPRT en son extrémité C-terminale. ExoT possède 76% d'homologie avec ExoS [120]. Comme pour ExoS, l'activité d'ExoT requiert la présence des protéines 14-3-3 [120].

L'activité du domaine GAP d'ExoT cible les protéines RhoA, Rac et CDC42 *in vitro* et *in vivo* entraînant ainsi une destruction du cytosquelette d'actine et l'inhibition de la phagocytose [121, 122]. Le domaine ADPRT d'ExoT est impliqué dans la mort cellulaire [1, 28, 125]. En effet, ExoT est responsable de l'apoptose des cellules épithéliales [123] et des neutrophiles [124]. L'importance d'ExoT dans la pathogénie pulmonaire de *P. aeruginosa* est limitée comparé à ExoS ou ExoU, car sa délétion n'influe pas sur la persistance des bactéries au niveau pulmonaire, bien qu'ExoT favorise la dissémination systémique des bactéries [125].

b. ExoY

ExoY est une adénylate cyclase bactérienne qui convertit l'ATP en AMP cyclique, pouvant augmenter jusqu'à 500 fois ses niveaux dans la cellule [126]. Son activité adénylate cyclase est similaire à d'autres adénylates cyclases bactériennes, comme l'*edema factor* (*B. anthracis*) ou CyaA (*B. pertussis*). Une étude a montré qu'ExoY induisait un changement dans l'expression des gènes de la cellule hôte [112], bien que le rôle majeur de la toxine ExoY soit la formation de pores, de par sa localisation proche de la membrane [127].

Tableau 2 : Informations sur les effecteurs du T3SS de *P. aeruginosa*.

Effecteurs	Masse (kDa)	Activité	Principales cibles	Co-facteur
ExoS	48	GAP ADPRT	Rho, Rac, CDC42 Ras, Ezrine, Radixine, Moesine	14-3-3
ExoT	49	GAP ADPRT	Rho, Rac, CDC42 CRKI, CRKII	14-3-3
ExoY	42	Adénylate cyclase	ATP	ND
ExoU	74	PLA2	Phospholipides Lysophospholipides	Ubiquitin PI (4,5)P2

GAP : GTP-ase Activating Protein. ADPRT : ADP-RibosylTransferase. PI (4,5)P2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Adapté de [28].

ExoY participe à la destruction de l'épithélium et à la dissémination de *P. aeruginosa* [128, 129], même si son rôle dans la pathogénicité *in vivo* reste cependant négligeable [130, 131].

c. ExoU

ExoU est une phospholipase A2 (PLA2) bactérienne, induisant une mort cellulaire rapide chez l'hôte [132, 133]. Elle possède un domaine patatine-like semblable à celui retrouvé chez les PLA2 eucaryotes (iPLA2 et cPLA2, voir chapitre 3). ExoU hydrolyse les phospholipides membranaires des cellules de l'hôte en position sn-1/2, dont résulte le relargage d'acides gras libres et de lysophospholipides. ExoU requiert la présence de co-facteurs de l'hôte pour son activation, en induisant un changement conformationnel de la toxine ou en la liant à ses substrats. Différentes cibles ont pu ainsi être identifiées, comme l'ubiquitine ou le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [134, 135]. ExoU possède également un domaine MLD à son extrémité C-terminale qui adresse ExoU à la membrane des cellules eucaryotes. L'hydrolyse des phospholipides membranaires conduit à une rapide perte de l'intégrité membranaire, semblable à un phénomène nécrotique. L'activité de la toxine ExoU est

importante dans les modèles de pneumonie à *P. aeruginosa* chez la souris. En effet, il a récemment été démontré qu'un délai de 3 heures dans la sécrétion d'ExoU était suffisant pour augmenter la clairance bactérienne et ralentir la mort des souris [136]. ExoU est également capable de modifier l'expression des gènes au niveau des cellules épithéliales [137] et d'inhiber l'activation de l'inflammasome [74].

D. Infections à *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa est une bactérie de l'environnement, qui ne devient pathogène que si l'organisme qu'elle infecte présente une prédisposition, c'est donc un pathogène opportuniste. La faiblesse de l'hôte peut être une diminution des défenses immunitaires (traitement aux corticoïdes, chimiothérapie, VIH) ou à une lésion de la peau et des muqueuses (brûlures, coupures). *P. aeruginosa* est le troisième micro-organisme responsable d'infections nosocomiales en France (8,4% des infections, rapport RAISIN 2012), juste derrière *E. coli* (26%) et *S. aureus* (15,9%). *P. aeruginosa* est majoritairement associés aux infections pulmonaires (18,1%) et aux infections des tissus mous et de la peau (44,1%) (Tableau 3).

Tableau 3 : Prévalence des bactéries dans différentes pathologies infectieuses humaines.

Bactérie	Infections Urinaires	Infections Muqueuses/peau	Infections Respiratoires	Infections Nosocomiales
<i>S. aureus</i>	3,5%	11,8%	14,7%	29,2%
<i>P. aeruginosa</i>	6,9%	44,1%	18,1%	6,9%
<i>E. coli</i>	49,8%	7,5%	9%	13,5%
<i>K. pneumoniae</i>	6,6%	3,7%	6,1%	2,3%
<i>E. faecalis</i>	6,1%	ND	ND	5,7%
Autres espèces	27,1%	32,9%	52,1%	42,4%

Adapté du rapport RAISIN 2012 disponible sur www.invs.fr

Les infections à *P. aeruginosa* sont une cause majeure de bactériémie chez les grands brûlés, où l'intégrité de la barrière physique de la peau est compromise. L'infection peut se faire directement à l'hôpital, mais peut également être apportée par le patient lui-même [138].

P. aeruginosa est également responsables d'infections acquises hors de l'hôpital, comme les infections oculaires (kératite ulcéreuse et endophtalmite) et les otites. Les infections oculaires à *P. aeruginosa* représentent une cause majeure de la perte de la vue à travers le monde,

conséquences d'un traumatisme oculaire ou du port prolongé de lentilles de contact [124]. Les infections auriculaires à *P. aeruginosa* affectent le conduit externe de l'appareil auditif, il est question d'otites externes. C'est une infection très fréquemment observée chez les baigneurs réguliers en piscine, lui donnant le nom d'otite des piscines [139].

Mais ce sont bien les infections pulmonaires qui représentent la première cause d'infection à *P. aeruginosa*, qu'elles soient aiguës en service de soin intensifs (pneumonies), ou chroniques dans la mucoviscidose et la bronchopathie pulmonaire chronique obstructive [140, 141]. Les infections chroniques observées dans la mucoviscidose sont associées à un changement de phénotype de *P. aeruginosa*, qui le rend plus adapté à son environnement, lui permettant de persister dans les poumons, généralement sous forme de biofilms.

E. Biofilm

1. Mécanismes de communication bactérienne, le *Quorum sensing*.

La formation du biofilm ainsi que l'expression de nombreux facteurs de virulence est sous le contrôle d'un système de communication bactérien appelé *quorum sensing* [142]. Les bactéries produisent des molécules auto-inductrices pendant leur croissance qui s'accumulent dans le milieu extérieur. Lorsque la densité cellulaire devient suffisamment élevée, les hautes concentrations d'auto-inducteurs vont permettre d'induire des changements d'expression des gènes dans la population bactérienne et notamment la production de facteurs de virulence [143] (Figure 7). *P. aeruginosa* produit deux types de molécules de signalisation : les HSL et le PQS [39].

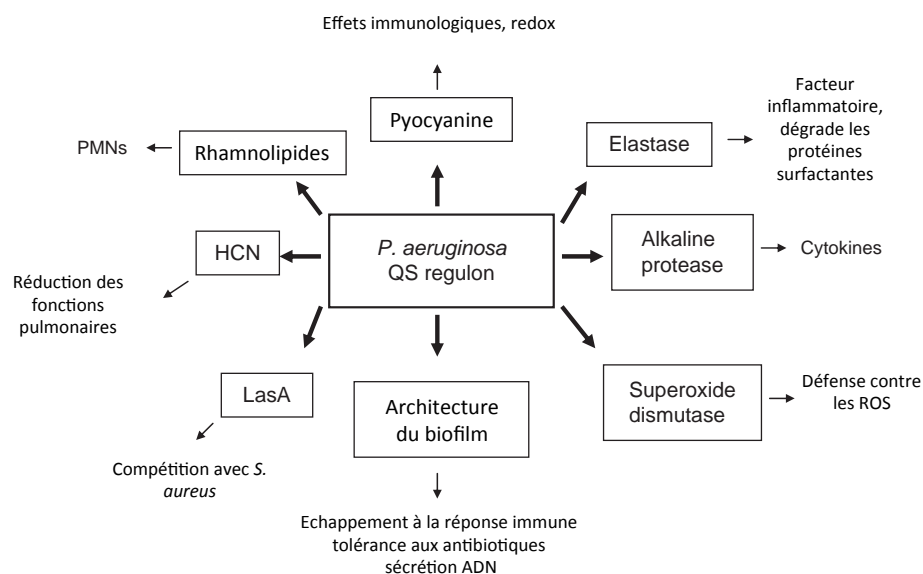


Figure 7: Facteurs de virulence contrôlés par le *Quorum sensing*.

Cette figure présente les processus bactériens contrôlés par le *Quorum sensing* et leur implication dans la mucoviscidose. Adapté de [143].

Les C12-HSL et C4-HSL sont produites par les systèmes LasRI et RhlRI respectivement et sont auto-induites, d'où leur nom d'auto-inducteurs. LasI et RhlI sont les molécules sécrétées qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire. Lorsque leur concentration est élevée, elles sont reconnues par les récepteurs cytoplasmiques LasR et RhlR. La formation du complexe LasR/I et RhlR/I induit leur fixation sur les promoteurs de certains gènes pour induire leur transcription (Figure 8). L'importance de ces systèmes dans la formation des biofilms varie selon les conditions expérimentales [144]. Il est cependant admis que le système LasRI est nécessaire pour la formation du biofilm de PAO1, mais l'implication de RhlRI est discutable [35, 145]. Les systèmes LasRI et PQS ont été montrés comme régulateurs de la formation de la matrice du biofilm, en induisant la lyse des cellules permettant le relargage d'ADN et en activant la synthèse de l'opéron *pel* impliqué dans la synthèse de polysaccharides qui contribuent à l'architecture du biofilm [35, 146, 147].

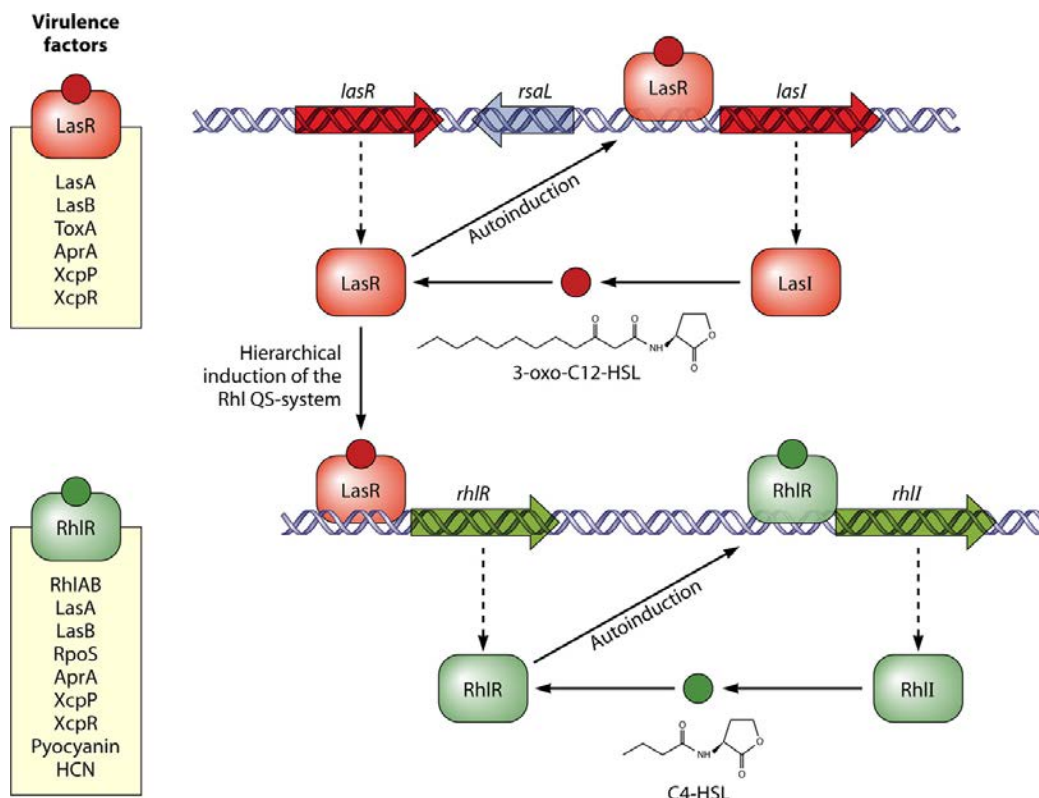


Figure 8 : Fonctionnement du *Quorum sensing*.

Le *quorum sensing* est un mécanisme de communication bactérienne qui implique des molécules auto-inductrices LasI et RhII. Ces auto-inducteurs sont reconnus par leurs récepteurs LasR et RhIR respectivement ce qui induit leur propre transcription ainsi que celle d'autres gènes comme les facteurs de virulence LasA, LasB ou la pyocyanine. Issu de [39].

2. Formation du biofilm

Les biofilms sont définis comme une communauté de micro-organismes adhérant à une surface [148]. Le biofilm procure à la bactérie de nombreux avantages pour se protéger des agressions extérieures ou trouver des nutriments. La formation des biofilms se déroule en 4 étapes, sans compter l'étape de dispersion (Figure 9). La première étape est celle d'adhérence qui est divisée en deux phases : l'adhérence réversible puis irréversible. Les bactéries utilisent les flagelles pour se déplacer vers la surface [149], mais également les flux environnementaux et les interactions ioniques faibles (Figure 9-I). Des molécules de surface de la bactérie interviennent ensuite dans la phase d'adhérence irréversible (Figure 9-II). Les premières bactéries adhérentes peuvent être appelées colonisateurs primaires. Dans la troisième étape, les colonisateurs primaires vont commencer à se diviser ce qui induit la formation de microcolonies (Figure 9-III), sur lesquelles vont se fixer de nouvelles bactéries planctoniques.

La quatrième étape correspond à la maturation du biofilm, où la motilité des bactéries (*twitching* et *swarming*) joue un rôle important (Figure 9-IV) [149]. Enfin, les bactéries sont libérées du biofilm (sous forme planctoniques mobiles ou aggrégées), c'est l'étape de dispersion (Figure 1-V) [142, 150].

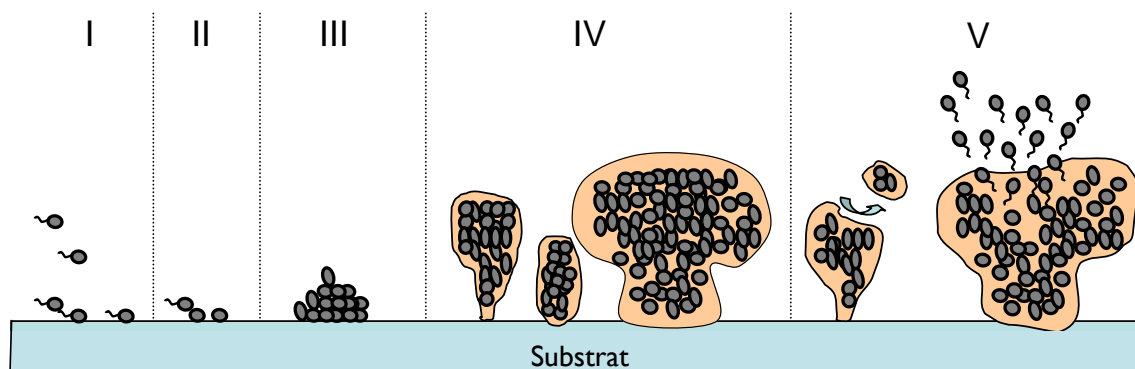


Figure 9: Etapes de formation du biofilm.

Etapes de formation du biofilm. Le biofilm est formé en quatre étapes à partir de cellules planctoniques, puis les bactéries s'en échappent. Lors de l'attachement, les bactéries vont être attirées par la surface avec les forces ioniques, les flux et leurs flagelles de façon réversible (I). Ensuite, les molécules de surface bactériennes (adhésines, *fimbriae*, *pili*) vont intervenir pour permettre l'adhérence irréversible (II). Dans un second temps les bactéries déjà adhérentes à la surface (colonisateurs primaires) vont permettre la fixation d'autres bactéries planctoniques, c'est la formation des microcolonies (III). La maturation des microcolonies permet la formation d'un biofilm mature (IV). Enfin la dernière étape consiste en l'essaimage des bactéries du biofilm (V). Adapté de [142].

La colonisation des voies respiratoires est réalisée par des souches non-mucoïdes environnementales. Au cours de la colonisation chronique, *P. aeruginosa* s'adapte, forme des biofilms et change de phénotype pour devenir mucoïde, qui correspond à une hypersécrétion d'alginate [32, 151]. Cependant la sécrétion d'alginate n'est pas nécessaire pour la formation des biofilms [152]. La mucoïde procure un phénotype plus avantageux dans la persistance au niveau des voies respiratoires en diminuant la toxicité pour l'hôte et en augmentant la résistance aux traitements antibiotiques. En effet la présence d'alginate dans la matrice extracellulaire des biofilms conduit à un biofilm plus épais et plus différencié, augmentant la résistance aux antibiotiques et à la phagocytose [6]. La mucoïdie est obtenue après conversion des souches non-mucoïdes exposés aux défenses de l'hôte et à l'environnement [30]. Une mutation spontanée dans le gène *mucA* est dans 84% des cas responsable du passage à la mucoïdie [153, 154]. MucA inhibe la synthèse d'alginate en séquestrant le facteur sigma AlgU, activateur de la transcription des régulateurs secondaires

(dont AlgR) de l'opéron *alg* [30, 31]. AlgU est responsable de la surexpression de l'opéron *alg* chez les souches mucoïdes, mais permet également d'obtenir des biofilms épais et résistants aux flux de milieu chez des souches non mucoïdes, en stimulant indirectement la transcription des gènes de l'opéron *psl* [155]. Le changement phénotypique observé chez *P. aeruginosa* dans son stade chronique d'infection entraîne également une perte de l'expression de certains facteurs de virulence. Une fois MucA inactivé, AlgU est libéré et va aller jouer un rôle répresseur sur l'expression des gènes codant pour le T3SS, les *pili* et le flagelle. En effet, les souches de *P. aeruginosa* isolées de patients chroniquement infectés par *P. aeruginosa* présentent une cytotoxicité diminuée, corrélée à une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la régulation du T3SS [130, 156].

II. Système de défense innée

A. Généralités

1. Premier rempart

Le corps humain possède tout un arsenal lui permettant de se protéger des micro-organismes envahisseurs. La première barrière que rencontrent ces derniers est la barrière physique constituée de la peau et des muqueuses. Les cellules y sont très étroitement juxtaposées, ce qui les rend imperméables aux agents infectieux. Elles préviennent l'entrée de tout corps étranger en se plaçant entre le milieu intérieur et le milieu extérieur.

2. La deuxième ligne de défense: la réponse immunitaire

Lorsqu'un pathogène franchit cette première barrière physique, l'infection est combattue par le système immunitaire [157]. Dans un premier temps, une réponse discriminante d'un antigène, mais non spécifique, la réponse immunitaire innée, intervient [12]. Elle est basée sur la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) par des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules épithéliales, des neutrophiles et monocytes/macrophages [158]. L'activation de la réponse immunitaire innée conduit à la sécrétion de molécules de communication cellulaire, les cytokines, qui vont orchestrer la réponse immunitaire, en induisant l'expression de facteurs antimicrobiens, le recrutement d'autres cellules de l'immunité, contribuant à la réponse inflammatoire [12, 157]. La réponse inflammatoire est composée de 4 phases:

- une phase d'initiation qui correspond à l'activation des cellules présentes (épithéliales, macrophages) sur le site, qui vont à leur tour sécréter des molécules attirant de nouvelles cellules de l'immunité, notamment les neutrophiles.
- une phase d'amplification, au cours de laquelle la réponse des premières cellules se développe en parallèle à une intensification de l'infiltration de nouvelles cellules.
- une phase de stabilisation qui correspond à l'arrêt de l'amplification par neutralisation des signaux de l'inflammation et élimination des débris cellulaires.
- une phase de résolution qui vise à restaurer les tissus endommagés.

La réaction inflammatoire est finement contrôlée par la sécrétion en parallèle des médiateurs pro-inflammatoires, de médiateurs anti-inflammatoires, exerçant un rétrocontrôle négatif sur l'inflammation [159]. Une inflammation non contrôlée, ou chronique, conduit à la destruction des tissus sains sous-jacents, car les cellules de la réponse inflammatoire ne différencient pas le soi du non soi.

Le troisième niveau de défense correspond à la défense adaptative qui fait intervenir les lymphocytes. Cette défense est spécifique d'un pathogène donné. Elle intervient plusieurs jours après le premier contact avec le pathogène [160]. Différents types de lymphocytes sont impliqués dans la réponse adaptative, les lymphocytes T constituant la réponse cellulaire, et les lymphocytes B constituant la réponse humorale [161].

B. Immunité Innée Pulmonaire

1. Anatomie du poumon

Les poumons sont des organes invaginés assurant les échanges gazeux entre l'organisme et l'environnement extérieur. Le cycle respiratoire est constitué des mouvements thoraciques permettant l'inspiration et l'expiration. En parallèle du cycle respiratoire, les alvéoles reçoivent du sang pompé par le coeur. Au repos, 4 litres d'air et 5 litres de sang traversent les poumons par minute. Lors d'un effort, ces quantités sont augmentées.

L'air passe par le nez ou par la bouche, traverse le pharynx et le larynx (voies aériennes supérieures) puis parvient à la trachée, qui se divise en deux bronches souches atteignant les deux poumons. Les deux bronches souches se ramifient de plus en plus pour former les bronches et bronchioles, de plus en plus fines. Enfin, les voies respiratoires aboutissent *via* les bronchioles terminales à de petites cavités pulmonaires, les alvéoles. Les échanges gazeux sont réalisés par ces alvéoles, à travers les fines membranes qui les séparent des capillaires sanguins.

En raison de son rôle physiologique, le poumon est continuellement exposé à de nombreuses particules provenant de l'environnement (macromolécules, nanoparticules, micro-organismes). Malgré cela, les voies respiratoires restent "stériles". Le poumon possède donc un ensemble de mécanismes de défenses (physiques, cellulaires, protéiques) lui permettant de conserver son intégrité tissulaire.

2. Cellules de l'immunité innée

a. Cellules épithéliales

A l'image de la peau, les cellules épithéliales pulmonaires constituent une barrière physique, imperméable aux micro-organismes. Un deuxième mécanisme de défense est constitué de mucus, liquide visqueux présent à la surface des cellules épithéliales. Il est produit par les cellules caliciformes [162]. Il est composé de glycoprotéines (mucines) et de protéoglycanes, protégeant le tractus respiratoire en captant et exportant grâce au mouvement des cils

vibratiles épithéliaux, les particules exogènes qui pénètrent les voies respiratoires [162]. L'épithélium pulmonaire produit également des peptides antimicrobiens qui permettent d'éliminer les micro-organismes [163]. Les cellules épithéliales expriment des récepteurs permettant la reconnaissance des pathogènes à la surface de leur membrane et sécrètent des cytokines permettant d'attirer les neutrophiles sur le site de l'infection [164].

b. Macrophages alvéolaires.

Les macrophages alvéolaires (MAs) sont les premières cellules phagocytaires répondant aux agressions de l'appareil respiratoire par des agents infectieux, allergènes ou particules [165]. Ce sont des cellules résidentes issues de la différenciation des monocytes, les plus représentées dans l'espace alvéolaire. Chez un individu sain, les MAs représentent 90% des cellules présentes dans la lumière alvéolaire contre 1% de lymphocytes et 10% de neutrophiles [165]. Ces cellules de l'immunité expriment différents types de récepteurs permettant d'induire la réponse immunitaire de l'hôte: récepteur au complément, récepteur des immunoglobulines, récepteurs au mannose et également des récepteurs permettant la reconnaissance des pathogènes, les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) de type Toll, NOD ou C-lectine (voir partie B3) [158, 160, 166]. Lors d'une faible invasion microbienne, les MAs phagocytent les microorganismes sans déclencher de réponse immunitaire forte. Si la charge est plus élevée, l'activation des récepteurs par leurs ligands respectifs déclenche la réponse immunitaire innée, avec notamment la sécrétion de cytokines et chimiokines, médiateurs qui vont permettre de recruter sur le site infectieux, les neutrophiles, autres cellules phagocytaires professionnelles [158, 160, 166].

c. Neutrophiles.

Les neutrophiles sont les "soldats" de l'immunité innée et constituent la force de défense la plus importante lors d'une infection par un micro-organisme. Les neutrophiles sont recrutés sur le site infectieux par les chimiokines comme l'IL8 ou le leukotriène B₄ (LTB₄) [18, 167]. Les cellules endothéliales répondent également aux médiateurs de l'inflammation en exprimant des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium vasculaire, qui vont permettre aux neutrophiles de se fixer et d'adhérer aux parois des vaisseaux. Il s'en suit une migration à travers l'endothélium vers le site infectieux, où les neutrophiles phagocytent les pathogènes, produisent des molécules antimicrobiennes [168]. Ils sont appelés sur le site de

l'infection à des temps courts afin de lutter efficacement et de limiter la dissémination des agents infectieux [38].

d. Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont produits en réponse aux molécules des micro-organismes reconnues par les récepteurs des cellules de l'hôte. Les PAMs peuvent être de petits peptides cationiques (défensines, cathélicidine, phospholipases) ou des protéines de poids moléculaire plus important (lysozyme, lactoferrine) [163, 168]. Bien que le mécanisme précis d'action des PAMs ne soit pas très bien connu, la plupart déstabilisent la membrane des bactéries et induisent la formation de pores, avec pour conséquence le relargage du contenu cytoplasmique [163]. Les principaux PAMs, avec leur activité et leur source cellulaire sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Les principaux peptides antimicrobiens, leur source et mode d'action.

Peptide antimicrobien	Source cellulaire	Mode d'action
Lysozyme	Macrophages alvéolaires Neutrophiles Cellules séreuses	Hydrolyse du peptidoglycane
Complément	Macrophages alvéolaires Fibroblastes Cellules épithéliales alvéolaires	Perméabilisation de la membrane par le complexe d'attaque membranaire
Lactoferrine	Cellules séreuses Neutrophiles	Chélation du fer Perturbation de la membrane bactérienne
Cathélicidines (hCAP18 et LL-37)	Cellules épithéliales Neutrophiles Macrophages	Perméabilisation de la membrane bactérienne
Lipocaline	Neutrophiles	Chélation du Fer
BPI	Neutrophiles Cellules épithéliales	Perméabilisation de la membrane bactérienne
Serprocidines - Elastase - Cathépsine G - Azurocidine - Protéinase 3	Neutrophiles	Dégradation des protéines membranaires bactériennes
Histones	Neutrophiles (<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>)	Perméabilisation de la membrane bactérienne
sPLA2	Cellules épithéliales Macrophages alvéolaires	Hydrolyse des phospholipides membranaires
α défensines	Neutrophiles	Formation de pores dans la membrane
β défensines	Cellules épithéliales Macrophages alvéolaires	Formation de pores dans la membrane

Adapté de [163, 168, 169].

3. Reconnaissance des pathogènes

Les cellules épithéliales (bronchiques ou alvéolaires), les neutrophiles et les macrophages alvéolaires reconnaissent des motifs hautement conservés chez les pathogènes, appelés PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) [158]. Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs spécifiques, les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) qui peuvent être extracellulaires, membranaires ou cytoplasmiques [170]. L'activation de ces récepteurs induit la réponse immunitaire innée, conduisant à l'élimination du pathogène. Parmi les différents types de PRR impliqués dans la reconnaissance des PAMPs, les plus connus sont les récepteurs de type Toll (TLRs, *Toll-like Receptor*) et les récepteurs de type NOD (NLRs, *NOD-like Receptor*), les récepteurs de type lectine (CLRs) et les récepteur de type RIG-I (RLRs) [158, 171, 172].

a. Récepteurs de type Toll

Les Toll-like receptors (TLRs) sont les PRRs les plus étudiés depuis la découverte chez la drosophile de l'existence d'un récepteur permettant de reconnaître de manière spécifique un motif étranger et ainsi d'enclencher la réponse immunitaire [173] (Tableau 5). Chez l'homme, le premier TLR à avoir été identifié est le TLR4 [174]. Depuis la découverte du TLR4, 10 TLRs ont été mis en évidence chez l'homme (TLR1-10) et 11 chez la souris (TLR1-9, 11, 12) [158]. Les TLRs fonctionnent en homodimères (TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12) ou hétérodimères (TLR1/TLR2, TLR2/TLR6). Les TLRs peuvent être classés selon leur localisation membranaire ou intracellulaire [158]. Chaque TLR reconnaît des PAMPs issus de micro-organismes bien définis (Tableau 5). Certains TLRs peuvent également reconnaître des ligands endogènes, générés lorsque la cellule est endommagée. Ces ligands sont appelés DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) et regroupent notamment la protéine HMGB-1 ou l'ADN mitochondrial [175]. La fixation du ligand du TLR sur ce dernier conduit à une cascade de signalisation, résultant en l'activation de la réponse immunitaire pour éliminer le pathogène [176].

Tableau 5 : Les récepteurs de type Toll et leurs ligands issus de micro-organismes.

Récepteur	Ligand	Source du ligand
TLR1	Lipopeptides triacylés	Bactéries et mycobactéries
TLR2	Lipopeptides/Lipoprotéines	Nombreux pathogènes
	Peptidoglycane	Bactéries à Gram positif
	Acide lipoteichoïque	Bactéries à Gram positif
	Lipoarabinomannanes	Mycobactéries
	Porines	<i>Neisseria</i>
	Zymosane	Champignons
	Lipopolysaccharide atypique	<i>Leptospira, Porphyromonas</i>
TLR3	ARN double brin	Virus
TLR4	Lipopolysaccharides	Bactéries à Gram négatif
TLR5	Flagelline	Bactéries
TLR6	Acide Lipoteichoïque	Bactéries à Gram positif
	Lipopeptides diacylés	<i>Mycoplasma</i>
	Zymosane	Champignons
TLR7	ARN simple brin	Virus
TLR8	ARN simple brin	Virus
TLR9	Motif CpG de l'ADN	Virus, bactéries et parasites
TLR10	ND	ND
TLR11	Profiline	<i>T. gondii</i> , UPECs
TLR12	Profiline	<i>T. gondii</i>
TLR13	ARN ribosomal 23S	Bactéries

Adapté de [158, 170].

b. Signalisation des TLRs

Les TLRs, qu'ils soient membranaires ou endosomaux, possèdent un domaine extracellulaire constitué de domaine riches en leucines, appelés LRR (*Leucin-Rich Repeat* ou *Leucine Rich Region*) [176]. La fixation des PAMPs microbiens sur les domaines LRR facilite la dimérisation des TLRs (homo- ou hétéro-dimères) [177]. C'est la dimérisation des TLRs qui entraîne la cascade de signalisation à partir du domaine intracellulaire (Figure 10) [176]. Le domaine intracellulaire est très proche de celui du récepteur de l'IL1, le domaine TIR pour *Toll /IL1 Receptor domain* [176, 178]. Le domaine TIR permet le recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 (*Myeloid-Differentiation primary response gene 88*) dans la plupart des cas, bien que d'autres protéines soient également impliquées dans l'initiation de la cascade de signalisation: TRAL, TRIF et TIRAP [177] (Figure 10). MyD88 possède également un domaine TIR au niveau de son extrémité C-terminale et un domaine de mort (*death domain*) au niveau de son extrémité N-terminale. Via ce dernier, MyD88 active le recrutement du complexe IRAK1/2/4-TRAF6 en interagissant avec la protéine IRAK4, une kinase qui va

phosphoryler IRAK1 [158]. Une fois activée, IRAK1 s'associe avec TRAF6. TRAF6 active à son tour le complexe TAK1-TAB2/3 qui peut alors activer deux voies de signalisation différentes: une voie impliquant les MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), conduisant à l'activation de facteurs de transcription comme AP-1 et une autre voie impliquant les protéine IKKs (*I κ B Kinases*) [176]. Celle-ci induit la phosphorylation de I κ B et sa dégradation par le protéasome, conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B [176]. Il existe également une voie indépendante de MyD88 qui fait intervenir d'autres molécules adaptatrices, TRAM et TRIF, et qui est impliquée dans la signalisation du TLR3 et du TLR4-endosomal [158]. Cependant, elles conduisent également *via* la kinase RIP1 à la signalisation *via* le complexe IRAK1/2/4-TRAF6 décrit précédemment [158].

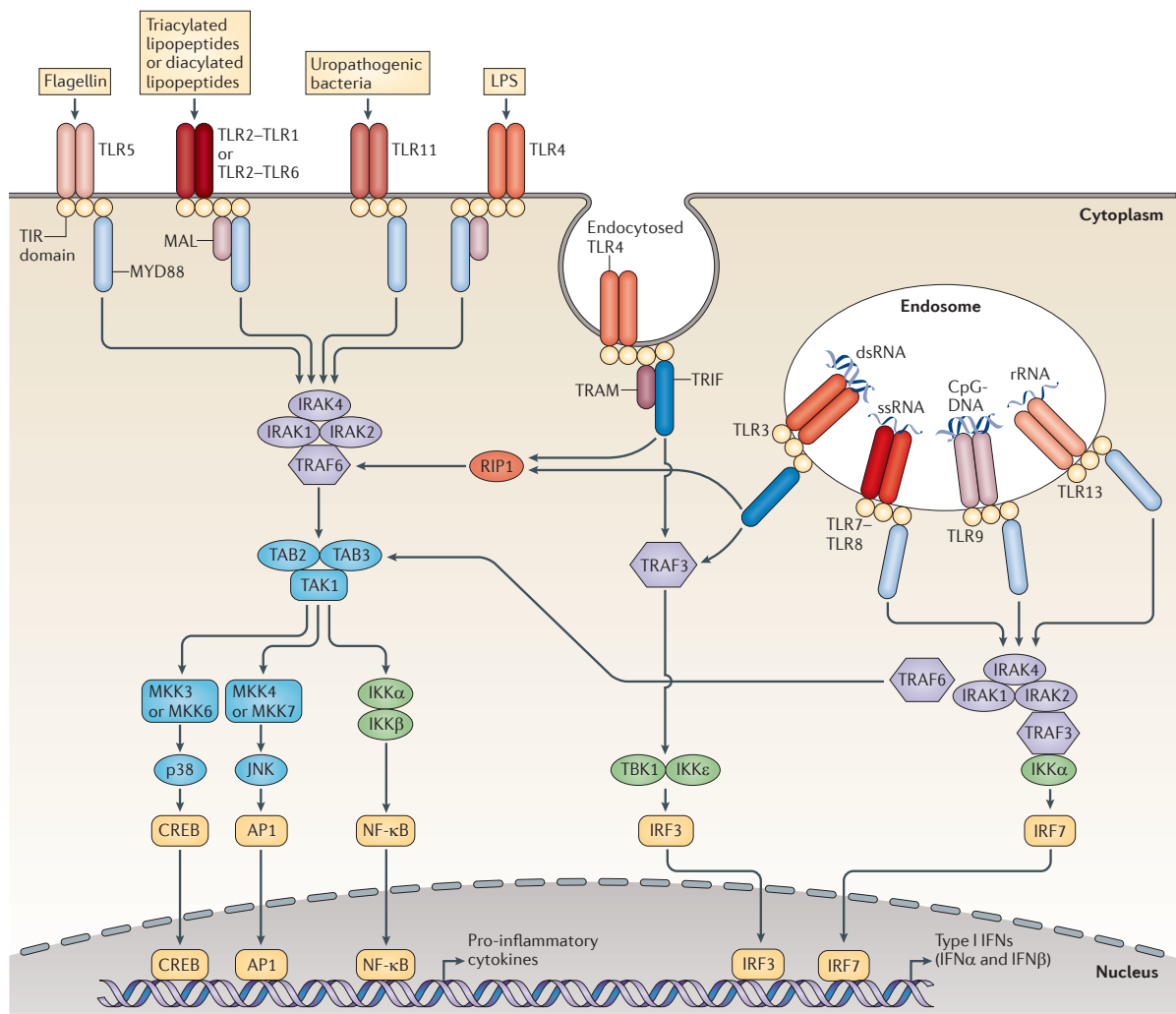


Figure 10: Voies de signalisation des récepteurs de type Toll.
Issu de [158].

c. Récepteurs de type NOD

Les récepteurs de type NOD possèdent comme les TLRs un domaine LRR qui leur permet de reconnaître les PAMPs microbiens présents au niveau du cytoplasme [171]. De nombreux récepteurs NOD ont été identifiés, dont les récepteurs NOD1, NOD2, NLRC4, NALP3, NAIP5. Les récepteurs de type NOD possèdent également un domaine CARD, qui leur permet d'interagir avec différents complexes impliqués dans la signalisation [179]. Sur ce dernier point, deux voies sont bien distinctes: une voie conduisant à l'activation de NF- κ B et une voie à l'activation des MAP kinases [180].

Les récepteurs NOD1 et NOD2 reconnaissent des motifs du peptidoglycane des bactéries. NOD1 reconnaît le motif iE-DAP, présent chez les bactéries à Gram négatif, alors que NOD2 reconnaît les motifs MDP, qui peuvent être trouvés aussi bien chez les bactéries à Gram négatif qu'à Gram positif [172]. L'activation de NOD1 ou NOD2 par la reconnaissance du peptidoglycane conduit au recrutement de la kinase RIP2/RICK qui possède également un domaine CARD, en position C-terminale [180]. Deux voies sont alors possibles. La première a pour conséquence le recrutement du complexe IKK et l'activation de NF- κ B [181]. La deuxième voie fait intervenir les MAPK p38, ERK et JNK [180].

Les récepteurs NLRC4 (ex-Ipaf), NAIP5 et NLRP3 mènent à l'activation de l'inflammasome en induisant l'activation du complexe ASC, lui-même régulateur du clivage de la pro-caspase 1 en sa forme mature qui est responsable du clivage de la pro-IL1 β en IL1 β mature [74, 182].

d. Autres récepteurs

D'autres récepteurs reconnaissant les pathogènes sont également exprimés au niveau de la membrane ou du cytoplasme. Les principaux récepteurs de type lectine (CLRs, *C-type Lectine Receptors*), sont exprimés à la membrane des cellules de l'hôte. Dectine 1 et 2, Mincle et DC-SIGN sont les principaux récepteurs [183]. Ils reconnaissent les sucres présents à la membrane des pathogènes, comme par exemple les beta-glucanes et alpha-mannose fongiques ou le mannose de *Mycobacterium tuberculosis* [183]. Ces senseurs conduisent à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [183]. Les récepteurs cytoplasmiques MDA-5 et RIG-I reconnaissent les ARN double brins viraux, entraînant la synthèse des interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires [184].

Récemment, un nouveau récepteur encore inconnu du LPS a été découvert. Ce récepteur est localisé dans le cytoplasme, reconnaît le LPS indépendamment du TLR4 (membranaire ou endosomal), et permet l'activation de l'inflammasome [185].

4. Récepteurs et *Pseudomonas aeruginosa*

a. TLR4

Le TLR4 reconnaît le LPS des bactéries à Gram négatif, comme *P. aeruginosa*. Bien que le rôle du TLR4 soit essentiel, il nécessite la formation d'un complexe comprenant le TLR4, les co-récepteurs MD2 et CD14 ainsi que la protéine de liaison au LPS (*LBP: LPS-Binding Protein*) [186]. La LBP se fixe au lipide A du LPS bactérien avec une affinité très forte. Le LPS est alors transféré sur le récepteur CD14 [187]. Ainsi fixé, le LPS interagit avec le domaine extracellulaire du TLR4 *via* MD2. C'est la liaison du LPS au TLR4 qui conduit à la cascade de signalisation décrite précédemment.

Dans un modèle d'infection oculaire, l'absence du TLR4 réduit la résistance à *P. aeruginosa* et induit une réponse inflammatoire augmentée [188]. L'absence du TLR4/MD-2 au niveau de la cornée diminue également la clairance bactérienne, conséquence d'un afflux de neutrophiles moindre sur le site de l'infection [189]. Au niveau pulmonaire, en utilisant un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa*, Skerrett et al. ont montré une diminution des cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL1 β) mais une clairance bactérienne équivalente entre les souris TLR4^{+/+} et TLR4^{-/-} [190]. Ces auteurs montrent cependant que MyD88 joue un rôle important dans la clairance bactérienne. Cependant, Ramphal et al. ont démontré que la présence du TLR4 permettait de contrôler l'infection, augmentant la survie des souris infectées et la sécrétion de cytokines inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires [191]. Une étude ultérieure a montré que l'absence du TLR4 diminuait la sécrétion de cytokines inflammatoires par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales, dans un processus dépendant de MyD88 [192]. Récemment, il a été mis en évidence que la sécrétion de vésicules de la membrane externe (OMV, *Outer Membrane Vesicles*) pouvait induire une réponse inflammatoire par les cellules épithéliales pulmonaires, diminuée lorsqu'un inhibiteur du TLR4 est appliqué avant la stimulation [193].

b. TLR2

Le TLR2 reconnaît les pili de *P. aeruginosa* en association avec le récepteur de surface asialo GM1 qui permet l'enclenchement de la cascade de signalisation [194, 195]. La fixation des

pili au complexe TLR2/asialo-GM1 induit le relargage de l'ATP dans le milieu extracellulaire. L'ATP extracellulaire se lie au récepteur purinergique P2Y, qui signale via les protéines G couplées à la membrane et la phospholipase C et la formation de PIP3. La voie de la protéine kinase C (PKC) est alors activée, soit par relargage de calcium au niveau du réticulum endoplasmique, soit par formation de diacylglycerol au niveau de la membrane [195]. La PKC entraîne la phosphorylation de ERK et l'activation du facteur de transcription AP-1. Il a également été démontré que le TLR2 pouvait reconnaître la flagelline de *P. aeruginosa* [196] et le LPS [197]. Les souris TLR2^{-/-} infectés par la souche PAK de *P. aeruginosa* au niveau pulmonaire présentent une clairance bactérienne similaire à celle observée chez les souris TLR2^{+/+}, corrélée à un profil de sécrétion de cytokine similaire, suggérant que ce TLR joue un rôle mineur dans l'élimination des bactéries [190]. De plus, de récents travaux ont démontré que les souris TLR2^{-/-} présentaient une résistance accrue à la pneumonie à *P. aeruginosa*. Ce phénomène est associé à une augmentation de la clairance bactérienne et à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires [198]. Cependant ces résultats restent controversés, car les cellules épithéliales pulmonaires sécrètent des cytokines pro-inflammatoires en réponse à *P. aeruginosa* via l'activation du TLR2 et du TLR5 [199].

c. TLR5

Le TLR5 reconnaît la flagelline de *P. aeruginosa* [178]. Des travaux suggèrent que la flagelline dans sa forme intégrale n'est pas le PAMP reconnu par le TLR5, mais c'est le monomère qui la compose qui est reconnu et déclenche la réponse inflammatoire de l'hôte [164, 200]. Les souris TLR5^{-/-} présentent une clairance bactérienne diminuée, corrélée à une altération du recrutement des neutrophiles et à une inflammation pulmonaire altérée [201]. De plus, l'infection pulmonaire de souris par une souche de *P. aeruginosa* déficiente en flagelline conduit à une élimination bactérienne diminuée comparée à la souche sauvage et se traduit par une diminution de la survie des souris [190, 191]. Ce phénomène n'est pas dû à une diminution de la mobilité, qui peut se traduire par une croissance diminuée, mais bien à un échappement à la reconnaissance par les cellules de l'hôte [202]. Des résultats semblables sont obtenus dans des modèles d'infection oculaires par *P. aeruginosa* [189]. La fixation des monomères de flagelline sur le TLR5 entraîne l'activation des MAPK p38 et ERK et l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB, puis à la sécrétion des cytokines inflammatoires et mucines par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales [164, 192, 199, 203, 204]. La réponse à la flagelline est dépendante de la voie MyD88 [164, 192].

Récemment, il a été démontré que les souches mucoïdes de *P. aeruginosa* pouvaient induire l'activation de la MAP kinase p38alpha *via* le TLR5 [199, 204]. Enfin, la phagocytose de *P. aeruginosa* par les macrophages alvéolaires de souris a été décrite comme un phénomène dépendant du TLR5 [205].

d. TLR9

Le TLR9 est impliqué dans la reconnaissance des motifs CpG de l'ADN des bactéries et de certains virus [206, 207]. La fixation de l'ADN de *P. aeruginosa* sur le TLR9 induit la sécrétion d'IL8 par un mécanisme indépendant des facteurs de transcription NF-κB et AP-1 [208]. Récemment, il a été montré que les souris TLR9^{-/-} résistaient mieux à l'infection par *P. aeruginosa*, se traduisant par une meilleure clairance bactérienne et une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires aux temps précoces[38].

C. Mucoviscidose

1. Généralités

La mucoviscidose (MV) est une maladie génétique autosomale récessive affectant principalement les populations d'origine caucasienne. Cette pathologie est due à une/des mutation(s) du gène *Cfr*, codant pour la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) [209, 210]. Le CFTR permet l'export des ions chlorure à travers la membrane des cellules épithéliales.

Le CFTR appartient aux transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette), utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter activement les substrats à travers la membrane [211]. La protéine CFTR possède 7 domaines: un domaine C-terminal et un domaine N-terminal cytoplasmiques, 2 domaines transmembranaires composés de 6 segments transmembranaires, 2 domaines de liaison à l'ATP (NBD, *Nucleotide Binding Domain*) et un domaine régulateur R [210]. La structure de la protéine CFTR totale n'a pas encore été obtenue. Cependant, des études fonctionnelles du CFTR ont permis de mettre en évidence le rôle de chaque domaine dans la fonction du CFTR. Les domaines NBD se dimérisent et se lient et/ou hydrolysent l'ATP, modulant la fonction du CFTR [212]. La liaison/hydrolyse de l'ATP conduit à un changement de conformation des NBD qui déclenche l'ouverture ou la fermeture du CFTR [212, 213]. Les segments transmembranaires contribuent à la pénétration des anions et contrôlent le flux d'anions transmembranaire. Le domaine R est unique parmi les

transporteurs ABC car il est riche en sites consensus de phosphorylation par les protéines kinases A et C, nécessaires pour son activation [214-216]. Mais d'autres kinases peuvent cependant phosphoryler le domaine R [217].

Plus de 1900 mutations du CFTR ont été décrites, mais la plus fréquemment retrouvée est la mutation F508del-CFTR [218, 219]. Les mutations du CFTR ont été divisées en 6 classes:

- Classe 1: codon stop précoce dans le gène codant pour le CFTR, empêchant la synthèse du CFTR.
- Classe 2: défaut de maturation du CFTR, qui reste dans le réticulum endoplasmique. C'est le cas pour la mutation F508del-CFTR.
- Classe 3: le CFTR est adressé à la membrane, mais il ne fonctionne pas normalement.
- Classe 4: les mutations affectent la conductance et les mécanismes d'ouverture/fermeture du canal.
- Classe 5: la synthèse du CFTR est réduite.
- Classe 6: le CFTR est dégradé trop rapidement.

Selon la classe de mutation, la sévérité de la pathologie est différente, elle est plus sévère pour les mutations de classe 1 et 2 [220].

Les principales manifestations cliniques de la MV sont une atteinte du système digestif (pancréas et foie) et une pathologie pulmonaire sévère. La mutation du CFTR au niveau de l'épithélium pulmonaire entraîne une hyperabsorption d'eau conduisant à la déshydratation du mucus. Le mucus déshydraté et épais constitue alors un terrain favorable pour la colonisation chronique par des pathogènes opportunistes, contribuant également à une inflammation soutenue.

2. Mucoviscidose et immunité

La mutation du CFTR conduit à la présence d'un mucus visqueux, réduisant la clairance muco-ciliaire bronchique [221, 222]. De plus, le mucus abondant limite la sécrétion par les glandes sous muco-sales des PAMs favorisant ainsi la persistance des bactéries pathogènes [223]. Les niveaux en sels et de pH réduisent aussi l'activité des PAMs diminuant la clairance bactérienne [224, 225].

Les cellules épithéliales expriment fortement le CFTR et contribuent grandement à la défense immunitaire innée pulmonaire [226]. Dès lors, il pouvait être supposé qu'une mutation du CFTR dans les cellules épithéliales affecterait leur contribution à l'immunité innée. En absence de pathogène, les niveaux d'IL8 et de TNF dans les expectorations d'enfants MV sont

plus élevés que dans les expectorations d'enfants sains [227, 228]. Ce phénomène est reproduit *in vitro* avec des lignées de cellules épithéliales portant les mutations du CFTR [229], bien que ce résultat reste encore controversé [230]. De plus, après infection par *P. aeruginosa*, les cellules épithéliales MV sécrètent plus d'IL8 [231]. Différentes études ont mis en évidence que l'augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires était due à une activation constitutive des facteurs de transcription NF- κ B [229, 232, 233] et AP-1 [234]. L'augmentation de la sécrétion de l'IL8 conduit à un afflux massif de neutrophiles dans les voies aériennes [227], bien que la viscosité élevée des sécrétions affecte la migration des neutrophiles [235]. Ces cellules de l'immunité innée sont chargées d'éliminer les pathogènes (Cf. partie 3). Cependant, dans les poumons de patients MV, il a été montré que les neutrophiles n'assuraient plus leur rôle dans l'élimination des bactéries dû à un défaut d'acidification des lysosomes [236]. Cependant, une étude récente a montré que le défaut de fonction des neutrophiles n'était pas dû à la mutation du CFTR mais au microenvironnement pulmonaire [237]. De plus, l'accumulation de neutrophiles dans les voies aériennes contribue à une augmentation de la concentration en espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*). Les ROS sont associés à une augmentation de la sécrétion d'IL8 et d'IL6 et à une diminution de l'expression du CFTR et à un défaut de l'autophagie [238, 239]. Les neutrophiles présents dans les voies aériennes des patients MV fournissent également de l'ADN lors de leur mort cellulaire et de leur dégranulation, ce qui contribue à l'inflammation et fournit de la matrice pour les biofilms bactériens [34]. Enfin, la mutation du CFTR au niveau des cellules épithéliales diminue l'expression du TLR4 et augmente l'expression du TLR5, contribuant à une inflammation soutenue [240, 241].

3. Pathogènes bactériens dans les poumons de patients MV

La viscosité du mucus et la défaillance immunitaire fournissent un terrain favorable à la colonisation par des pathogènes divers, qu'ils soient bactériens, viraux ou fongiques (Figure 11). Les deux principaux pathogènes retrouvés dans les patients MV sont *S. aureus*, qui prédomine dans les stades précoces de la maladie et *P. aeruginosa*, qui est dominant chez les patients adultes [156] (Figure 11).

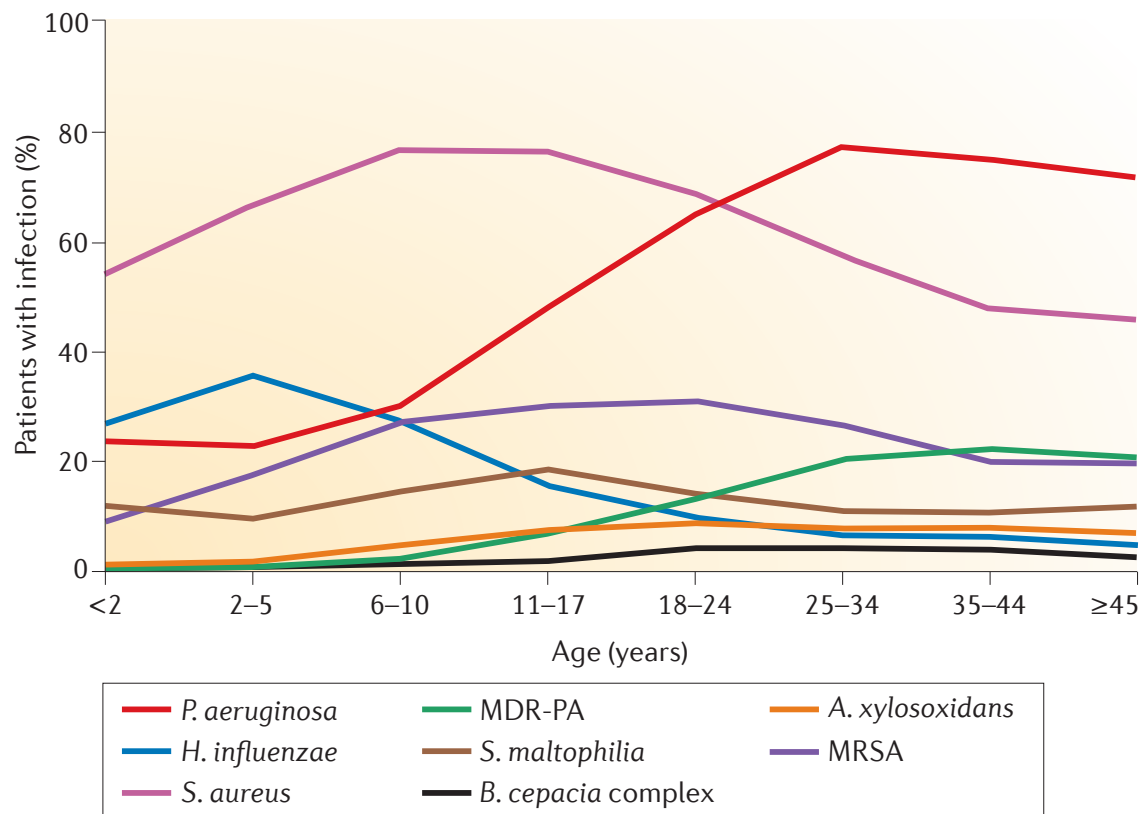


Figure 11: Prévalence des infections bactériennes dans la mucoviscidose.

Le mucus visqueux dans les voies aériennes des patients mucoviscidosiques constitue une niche idéale pour la colonisation bactérienne. Les jeunes patients mucoviscidosiques sont principalement infectés par *Staphylococcus aureus*, alors que *Pseudomonas aeruginosa* prédomine chez les adultes. Issu de [156].

Les jeunes patients sont d'abord colonisés par *S. aureus*, puis sont colonisés par *P. aeruginosa*, qui d'une souche environnementale « virulente », va s'adapter à l'environnement pulmonaire de l'hôte afin de persister [85, 130, 156]. Il y a 3 stades dans la colonisation par *P. aeruginosa*:

- un stade intermittent pendant lequel les voies aériennes sont colonisées par différentes souches de *P. aeruginosa* de façon récurrente.
- un stade de transition, où *P. aeruginosa* persiste dans les voies aériennes, mais présente encore un phénotype environnemental.
- un stade chronique, qui se traduit par une augmentation croissante du nombre de bactéries retrouvé dans les expectorations et corrélé à un niveau d'inflammation plus élevé.

L'infection chronique à *P. aeruginosa* est un facteur d'augmentation des dommages au tissu pulmonaire et à une diminution de la fonction respiratoire [142].

Entre 15 et 20 ans, les infections chroniques des patients MV sont associées à un changement phénotypique et génétique de la bactérie en comparaison avec les souches environnementales,

malgré une diversité importante de souches en fonction de la localisation des bactéries dans les poumons [242, 243]. Le phénotype majoritairement associé aux souches chroniques de *P. aeruginosa* est un phénotype mucoïde et la bactérie réside principalement sous forme de biofilm [7] (Voir partie 2). Le phénotype mucoïde peut être induit par le stress oxydant [244] ou par les peptides antimicrobiens [245, 246].

III. Phospholipase A2

A. Définition

Les phospholipases A2 (PLA2s) appartiennent à une famille d'enzymes hydrolysant les phospholipides membranaires en position sn-2, générant des lysophospholipides et des acides gras libres, comme l'acide arachidonique (AA) [247] (Figure 12). Les PLA2s sont classées selon leur structure, leur localisation cellulaire et leur activité catalytique, dépendante ou non du calcium :

- les PLA2 cytosoliques (cPLA2), dont l'activité est dépendante du calcium.
- les PLA2 indépendantes du calcium (iPLA2), dont l'activité est indépendante du calcium.
- les PLA2 sécrétées (sPLA2), dont l'activité est dépendante du calcium.
- les acetyl-hydrolases PLA2 (PLA2-AH), dont l'activité est indépendante du calcium.
- les PLA2 lysosomales, dont l'activité est indépendante du calcium.

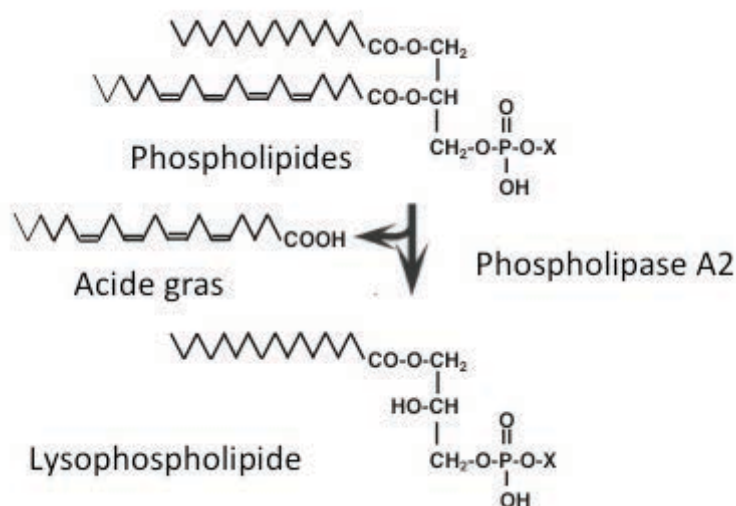


Figure 12 : Mode d'action des phospholipases A2.

Les phospholipides membranaires sont hydrolysés en position sn-2 par les phospholipases A2. Cette réaction génère un acide gras libre et un lysophospholipide. Adapté de [248]

B. Rôle physiologique des PLA2

Les PLA2 sont impliquées dans la régulation de l'immunité en catalysant la synthèse des eicosanoides et thromboxanes, après la libération d'AA par l'hydrolyse des phospholipides membranaires [247].

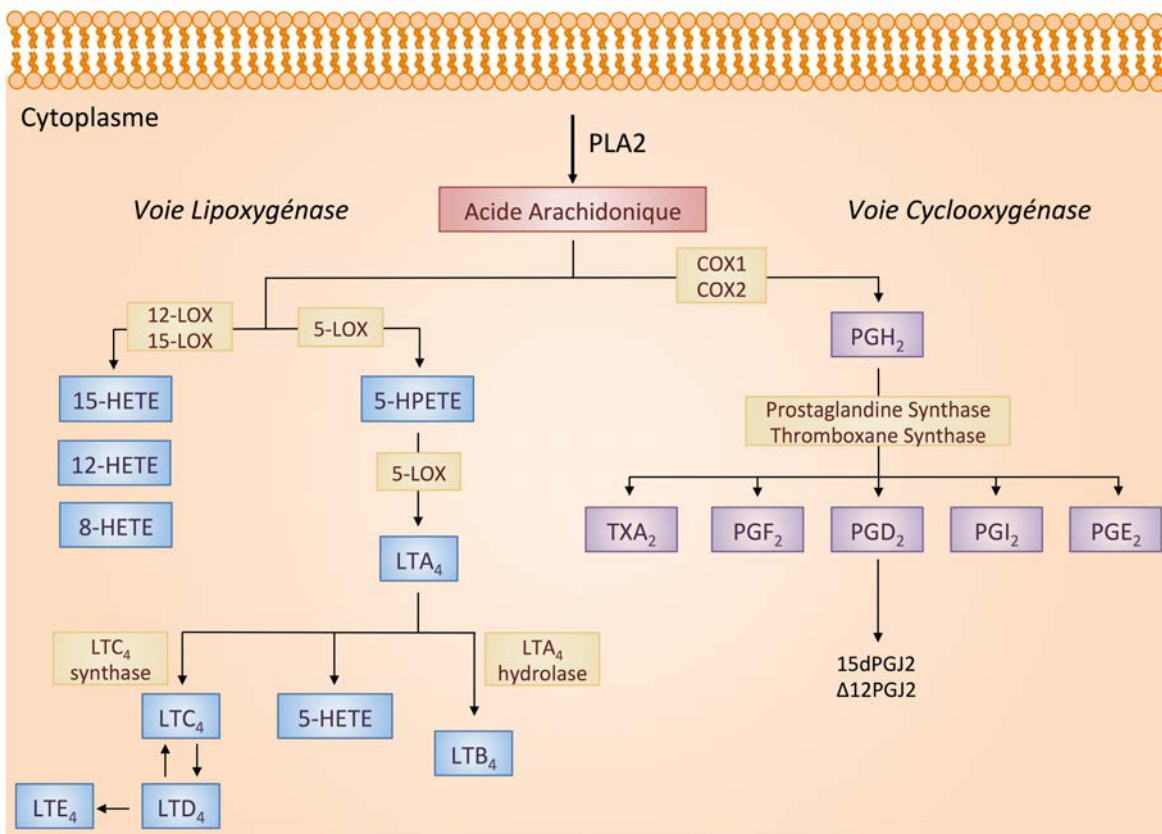


Figure 13 : Synthèse des médiateurs lipidiques.

Deux voies sont décrites permettant la synthèse de médiateurs lipidiques à partir de l'acide arachidonique : la voie cyclooxygénase et la voie lipoxygénase. La voie des cyclooxygénases fait intervenir les enzymes COX1 (PTGES1) et COX2 (PTGES2). La voie des lipoxygénases implique les 5-, 12- et 15-lipoxygénases. Adapté de [249].

Les eicosanoides sont divisés en deux classes: les prostanoides et les leukotriènes.

1. Voie des cyclooxygénases, COX1 et COX2

La synthèse des prostaglandines fait intervenir les cyclo-oxygénase (COX) 1 et 2 [249]. COX1 est exprimée constitutivement et est impliqué dans la régulation des fonctions physiologiques [249]. COX2 est inductible par de nombreux stimuli, dont des cytokines pro-inflammatoires (IL1β, TNFα) et par des bactéries dont *P. aeruginosa* [250]. COX2 est impliqué dans l'inflammation. COX1 et COX2 sont également connues sous le nom de PTGES1 et PTGES2 respectivement [249, 251]. L'activation des COX par l'AA conduit à la synthèse du PGG₂, immédiatement transformé en PGH₂ par l'activité peroxydase des COX (Figure 13) [167]. Le PGH₂ est ensuite métabolisé en PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂ ou thromboxane A₂ par les prostaglandines synthases et thromboxanes synthases respectivement

[249]. Les PGD_2 sont métabolisées en 15dPGD_2 et PGJ_2 . Ce dernier est transformé en 15dPGJ_2 et $\Delta 12\text{PGJ}_2$ [249].

2. Voie des lipoxygénases, LOX

La deuxième voie est celle des lipoxygénases (LOX), qui convertissent l'AA en leukotriènes et en acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) [249]. Plusieurs isoformes de LOX ont été décrites, les 5-LOX, 12-LOX et 15-LOX-1 et 15-LOX-2 [249]. Les 12-LOX et 15-LOX-1/2 utilisent l'AA pour la synthèse de 12-HETE et 15-HETE respectivement (Figure 13). Les 15-HETE sont ensuite métabolisées en lipoxines A₄ (LXA₄) et B₄ (LXB₄) [167]. La voie conduisant à la synthèse des leukotriènes fait intervenir la 5-LOX, activée en présence de FLAP (ou 5-LOX *Activating Protein*) [249]. Sous l'action de la 5-LOX, l'acide arachidonique est transformé en acide 5-hydroperoxyeicosatétraénoïque (5-HPETE), métabolisé ensuite en leukotriène A₄ (LTA₄) [249]. Le LTA₄ est ensuite métabolisé en plusieurs produits:

- 5-HETE, transformé en 5-ETE.
- leukotriène B₄ (LTB₄) sous l'action de la LTA₄ hydrolase.
- leukotriène C₄ (LTC₄) sous l'action de la LTC₄ synthase. Le LTC₄ est ensuite transformé en leukotriène D₄ (LTD₄) puis E₄ (LTE₄).

3. Récepteurs des médiateurs lipidiques

Les eicosanoïdes sont reconnus par des récepteurs présents à la membrane des cellules, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G [167, 249, 251]. Les eicosanoïdes sont rapidement métabolisés, car ils sont généralement produits à proximité de leur site d'action [167]. Il existe 9 récepteurs pour les prostanoides, 4 pour les PGE_2 (EP1, EP2, EP3, EP4), 2 pour les PGD_2 (DP1 et DP2), 1 pour les TXA_2 , les PGI_2 et les PGF_2 [252].

Les récepteurs des produits de la voie lipoxygénase sont au nombre de 6. Deux récepteurs ont été décrits pour les LTB₄ (BLT1 et BLT2) et LTD₄ (Cys-LT1 et Cys-LT2) et 1 récepteur pour les LXA₄ et 5-HETE [249].

En fonction du type de protéines G couplées aux récepteurs, les prostanoides vont pouvoir jouer un rôle stimulateur ou inhibiteur de l'inflammation pulmonaire [167, 249, 251].

La plupart des eicosanoïdes sont produits par les différentes cellules du poumon (Tableau 6)[167].

4. Médiateurs lipidiques dans l'inflammation pulmonaire

Certains prostanoides produits par les macrophages et cellules épithéliales sont associés à une inhibition de l'inflammation pulmonaire [252]. Par exemple, la PGE₂ réprime l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans un modèle d'infection par le virus Influenza [251]. Au contraire, la PGE₂ stimule la production d'IL10, une cytokine anti-inflammatoire, et favorise une réponse adaptative de type TH2 [253].

Tableau 6: Les principaux médiateurs lipidiques produits dans les poumons et leur source.

Type Cellulaire	Principaux médiateurs lipidiques
Cellules épithéliales pulmonaires	PGE ₂ , 15-HETE
Macrophages	TXA ₂ , PGE ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , 5-HETE
Monocytes	TXA ₂ , PGE ₂ , LTB ₄ , 5-HETE
Neutrophiles	LTB ₄ , 5-HETE
Eosinophiles	LTC ₄ , 15-HETE
Cellules endothéliales	PGI ₂ , PGE ₂

Adapté de [167].

Contrairement aux prostanoides, les leukotriènes sont généralement associés à une augmentation de l'inflammation. Dans un modèle d'asthme, le LTB₄ contribue à l'inflammation [254]. De plus, le LTB₄ est impliqué dans la défense pulmonaire contre les infections à *S. pneumoniae* [255].

C. Phospholipases A2 sécrétées

Parmi les PLA2s, 12 formes sécrétées (sPLA2) ont été identifiées chez les mammifères (sPLA2 IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIB et l'otoconine-90) (Tableau 7) [248]. Les sPLA2 sont classées en deux catégories, les sPLA2 conventionnelles I/II/V/X et les sPLA2 atypiques III et XII [247]. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire (de 14 à 19 kDa) qui possèdent 6 ponts disulfures et nécessitent la présence de calcium pour leur activité [256]. Le site de liaison au calcium (XCGXGG) et le site catalytique (DXCCXXHD) sont hautement conservés au sein des sPLA2 [247].

Les sPLA2s sont impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires, incluant la digestion et l'absorption des lipides membranaires, l'angiogenèse, la prolifération et migration cellulaire et

l'immunité innée [248]. Les sPLA2-IIA, V et X sont exprimés au niveau pulmonaire [254, 257, 258]. Elles contribuent à l'inflammation pulmonaire en participant à la synthèse des leukotriènes par hydrolyse des phospholipides membranaires. Dans le modèle d'asthme, les souris sPLA2-X^{-/-} présentent une diminution du nombre de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, corrélée à une diminution de la production des cytokines de type TH2 et des leukotriènes [254]. De la même manière, les souris sPLA2-V^{-/-} sont protégés de l'inflammation pulmonaire allergique, avec une diminution de la présentation des antigènes sur les complexes majeurs d'histocompatibilité, diminuant ainsi la réponse de type TH2 [259]. De plus, les souris sPLA2-V^{-/-} présentent un défaut de recrutement des neutrophiles lors de l'infection pulmonaire par *E. coli* et de l'infection péritonéale par *C. albicans*, se traduisant par une clairance microbienne diminuée [260, 261]. Les souris transgéniques surexprimant la sPLA2-V meurent à la naissance d'une détresse respiratoire due à la destruction du surfactant [262]. La sPLA2-IIA est impliquée dans diverses pathologies inflammatoires [257, 263, 264], mais son rôle le plus étudié et le plus important repose sur son activité antimicrobienne [250].

Tableau 7 : Caractéristiques des phospholipases A2 sécrétées.

Groupe	Origine	Source	Masse Moléculaire (kDa)	Ponts disulfures	Activité Antimicrobienne Bactéries à Gram +	Activité Antimicrobienne Bactéries à Gram -
IA	Cobra	Venin	13-15	7	Oui	Oui
IB	Mammifère	Pancréas Stromas Poumon	13-15	7	Oui	Non
IIA	Crotale, Mammifère	Venin Fluide synovial Macrophages Cellules épithéliales	13-15	7	Oui	Oui
IIB	Vipère	Venin	13-15	6	Non	Non
IIC	Rats Souris	Testicules	15	8	Oui	Non
IID	Homme Souris	Pancréas Rate	14-15	7	Oui	Non
IIE	Homme Souris	Cerveau Cœur Utérus	15-15	7	Oui	Non
IIF	Souris	Testicules Embryons	16-17	6	Non	Non
III	Homme, Souris, Abeille, Lézard	Neurones Testicules	15-18	8	Non	Non
V	Mammifère	Cœur Poumon Macrophages	14	6	Oui	Non
IX	Escargot		14	6	ND	ND
X	Mammifère	Rate, Thymus Leucocytes Testicules	14	8	Oui	Non
XIA	Riz	ND	12,4	6	ND	ND
XIB	Riz	ND	12,9	6	ND	ND
XIIA	Mammifère	Intestin	18,7	7	Oui	Oui
XIIB	Mammifère	Cœur Rate	19,7	7	Non	Non
XIII	Parvovirus	ND	<10	0	ND	ND
XIV	<i>Streptomyces</i> , champignon	ND	13-19	2	ND	ND
Otoconine-95	Homme	Oreille interne	90-95		ND	ND

Adapté de [247, 248].

D. Activité antimicrobienne de la sPLA2-IIA

Parmi les sPLA2, la sPLA2 de type IIA (sPLA2-IIA) est l'enzyme la plus étudiée pour son rôle antimicrobien, même si les sPLA2-X et sPLA2-V présentent une activité bactérienne à fortes concentrations [265, 266]. L'affinité de la sPLA2-IIA est plus élevée envers le phosphatidylglycerol (PG) et la phosphatidyléthanolamine (PE), principaux phospholipides bactériens qu'envers la phosphatidylcholine (PC), principalement retrouvée dans les membranes de cellules eucaryotes [267]. Les membranes bactériennes, chargées négativement, sont riches en PE et PG et sont hydrolysées par la sPLA2-IIA, constituant ainsi un mécanisme de défense de l'hôte contre les pathogènes bactériens [268, 269]. L'activité sPLA2 est augmentée dans les liquides biologiques de patients présentant une infection bactérienne systémique [270-272] ou des pathologies inflammatoires [273, 274]. Elle est très fortement augmentée par l'infection par *Salmonella* sv. Typhi et dans les cas de sepsis [270, 271]. Cowl et al., ont ainsi suggéré que la sPLA2-IIA était une protéine de la phase aigüe de l'inflammation [275].

En conséquences, l'activité antibactérienne de la sPLA2-IIA a été fortement étudiée et différents travaux ont rapidement décrit la sPLA2-IIA comme un puissant peptide antimicrobien [276-278]. La sPLA2-IIA présente dans le sérum des patients avec une infection aigüe est capable d'éliminer *S. aureus* et *L. monocytogenes in vitro* après 2 heures d'incubation [272]. De plus, la neutralisation de la sPLA2-IIA par immunoabsorption diminue significativement le pouvoir bactéricide des sérums [279]. C'est l'agent antimicrobien majeur impliqué dans l'élimination des bactéries dans les larmes chez l'homme [280]. Son activité antimicrobienne *in vitro* est plus élevée contre les bactéries à Gram positif qu'envers les bactéries à Gram négatif [277, 280]. En effet, les concentrations requises pour éliminer les bactéries à Gram positif sont faibles: *L. monocytogenes* 1,1ng/ml [265], *S. pyogenes* 0.1ng/ml [281], *B. anthracis* 50ng/ml [282] et *S. aureus* 15-80ng/ml [265, 280]. Les bactéries à Gram négatif sont également tuées mais avec une efficacité moindre du à la présence des lipopolysaccharides (LPS) à la surface de la membrane externe de ces dernières. Les LPS empêchent la pénétration de la sPLA2-IIA dans la membrane. Les concentrations de sPLA2-IIA requises sont supérieures à 10µg/ml [283]. L'ajout de lysozyme ou de BPI (*Bactericidal/Permeability-Increasing protein*) permet toutefois de faciliter l'hydrolyse de la membrane des bactéries à Gram négatif [276, 284].

Le rat et le cobaye constituent les modèles animaux pour étudier la sPLA2-IIA au niveau pulmonaire [257, 285], car chez la souris elle n'est pas ou très peu détectée dans les poumons

[258, 286]. En effet, la plupart des lignées de souris sont naturellement déficientes pour le gène codant pour la sPLA2-IIA [286]. Un modèle de souris transgéniques (Tg) surexprimant la sPLA2-IIA humaine a été généré pour étudier son rôle *in vivo* [287]. Les souris sPLA2-IIA-Tg expriment la sPLA2-IIA dans les différents organes dont les poumons, mais présentent une alopecie et développent une hyperplasie épidermique chronique [287]. Les souris sPLA2-IIA-Tg sont protégées de l'infection intra-péritonéale par *S. aureus* [288] et à l'infection pulmonaire par *B. anthracis* [289].

E. Régulation de l'expression de la sPLA2-IIA

La sPLA2-IIA est induite dans les pathologies inflammatoires. En effet, plusieurs études ont rapporté que l'expression de la sPLA2-IIA était induite par les cytokines proinflammatoires comme le TNF α , l'IL1 β ou encore l'IL6 [275, 290, 291]. Il a également été montré que l'expression de la sPLA2-IIA chez l'homme nécessitait l'activation du facteur de transcription C/EBP (CAAT-enhancer binding protein) et que ce processus était dépendant des facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP chez le rat [290, 292]. D'autres travaux ont mis en évidence l'implication des protéines kinases A et C ainsi que des Rho-kinases [293]. Plusieurs études rapportent que les mécanismes d'épigénétiques jouent un rôle important dans la régulation de la transcription de la sPLA2-IIA [293, 294]. En effet, ces auteurs montrent que la déméthylation de l'ADN au niveau de deux motifs CpG en position -111 et -82 augmente l'expression de la sPLA2-IIA. En fonction des tissus où elle est exprimée, la sPLA2-IIA est régulée de façon différente. En effet, dans les cellules musculaires lisses de rat, la toxine cholérique, la PGE₂ et la forskoline induisent l'expression de la sPLA2-IIA, suggérant que l'augmentation des niveaux d'AMPc régule positivement son expression [295]. Au contraire, ces mêmes molécules l'inhibent dans les MAs de cobaye en augmentant les niveaux d'AMPc, mettant en évidence le rôle ambivalent de l'AMPc en fonction du type cellulaire étudié [296]. Chez le cobaye, l'expression de la sPLA2-IIA est induite dans un processus dépendant de NF- κ B et inhibée par PPAR γ [297].

Les infections bactériennes représentent également un stimulus conduisant à l'expression de la sPLA2-IIA. Plusieurs études ont ainsi montré que des PAMPs bactériens étaient capables d'induire l'expression de la sPLA2-IIA *in vivo* et *ex vivo*. Chez le cobaye, l'instillation de LPS dans les voies respiratoires conduit à l'augmentation de l'expression de la sPLA2-IIA [257]. Dans cette étude, les auteurs ont également pu identifier les MAs de cobaye comme source

principale de sPLA2-IIA dans les poumons [257]. De même, l'instillation de LPS ou de *P. aeruginosa* vivant dans les poumons de rats induit l'expression de la sPLA2-IIA [285]. D'autres travaux ont également montré que *N. meningitidis* via son *pilus* et *B. anthracis* via le peptidoglycane étaient capables d'induire l'expression de la sPLA2-IIA dans les macrophages de cobaye [298, 299]. Chez l'homme le LPS d'*E. coli* induit la production de sPLA2-IIA par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales [300, 301]. Toutefois, différents travaux démontrent des mécanismes de subversion de l'expression de la sPLA2-IIA. *B. anthracis* est en effet capable d'inhiber la synthèse de sPLA2-IIA dans les MA de cobaye [299, 302]. *B. anthracis* secrète plusieurs toxines, l'edema toxine, composée de l'*edema factor* et de l'antigène protecteur, et la toxine létale (LT) qui inhibent l'expression de la sPLA2-IIA. L'*edema factor* et la LT sont impliquées dans ce processus, en augmentant les niveaux d'AMP cyclique et en inhibant l'activation des MAP kinases p38 et ERK ainsi que du facteur NF-κB [299, 302].

IV. But du travail

Le but général de cette étude a été d'élucider les régulations de l'expression de la sPLA2-IIA au niveau pulmonaire par deux bactéries pathogènes, *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre le rôle physiologique de la sélectivité de la sPLA2-IIA, appliqué à la mucoviscidose (MV). En effet, parmi les pathogènes (bactériens, fongiques, viraux) identifiés dans la mucoviscidose, *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont les plus fréquemment retrouvés. Il a été observé un changement dans la prévalence des espèces bactériennes dans l'infection pulmonaire des patients: *S. aureus* est plus fréquemment retrouvé chez les jeunes patients, alors que *P. aeruginosa* est dominant chez les adultes et est souvent associé à une dégradation de la fonction respiratoire. Cependant les mécanismes conduisant à ce changement de prévalence bactérienne dans les infections des patients MV restaient mal connus. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour l'expliquer. Premièrement l'utilisation d'antibiotiques pour traiter les infections bactériennes pourrait être liée à la diminution de *S. aureus* dans les poumons. Deuxièmement, *P. aeruginosa* sécrète une molécule anti-staphylocoque, LasA, qui pourrait intervenir. Cependant, ces hypothèses restent controversées et l'implication de la défense de l'hôte dans l'élimination de *S. aureus*, bien que diminuée dans la mucoviscidose, n'avait jamais été étudiée. Dans ce contexte, la sPLA2-IIA, dont l'activité antimicrobienne à faibles concentrations est sélective des bactéries à Gram positif, représentait un candidat potentiel idéal qui participerait à ce phénomène. De plus, l'expression de la sPLA2-IIA peut être induite par des *stimuli* bactériens. Nous avons donc avancé l'hypothèse que la sPLA2-IIA serait induite par *P. aeruginosa* et qu'en retour elle participerait à l'élimination de *S. aureus*, mettant en évidence un nouveau mécanisme dans lequel une bactérie manipulerait l'immunité innée afin d'éliminer une autre bactérie.

Dans un second temps, nous avons observé au cours de nos expérimentations que *S. aureus* n'induisait pas l'expression de la sPLA2-IIA dans les macrophages de cobaye. Ce résultat pouvait refléter un mécanisme d'inhibition de l'expression de la sPLA2-IIA, visant à échapper à son activité bactéricide. Des travaux du laboratoire avaient mis en évidence que *B. anthracis*, l'agent causal de l'anthrax était capable d'inhiber l'expression de la sPLA2-IIA. Nous avons donc recherché si un tel mécanisme pouvait exister pour *S. aureus*.

Résultats

Article 1: *Pseudomonas aeruginosa* manipulates host innate immunity to eradicate *Staphylococcus aureus*.

Nature Communications. Accepté.

Article 2: *S. aureus* adenosine inhibits sPLA2-IIA-mediated host killing in the airways.

Soumis à *Journal of Infectious Diseases*.

Article 1: *Pseudomonas aeruginosa* manipulates host innate immunity to eradicate *Staphylococcus aureus*.

Erwan Pernet, Laurent Guillemot, Pierre-Regis Burgel, Clemence Martin, Dominique Leduc, Isabelle Sermet-Gaudelus, Dorota Sands, Gerard Lambeau, Philippe Morand, Michel Chignard, Yongzheng Wu et Lhousseine Touqui.

Résumé :

Au sein du laboratoire et dans la littérature, il avait été montré *in vitro* et *in vivo* que la sPLA2-IIA possédait un effet bactéricide très puissant sur les bactéries à Gram positif, mais plus limité sur les bactéries à Gram négatif. Cependant, le rôle physiologique de cette sélectivité n'était pas connu. La mucoviscidose (MV) se traduit au niveau des poumons par un mucus épais et visqueux, qui constitue un terrain idéal pour la colonisation par des bactéries, comme *Staphylococcus aureus*, bactérie à Gram positif, et *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif. De manière très intéressante, les jeunes patients sont colonisés principalement par *S. aureus*, alors que *P. aeruginosa* domine chez les adultes, mais les mécanismes impliqués dans ce *switch* restent inconnus.

Nous avons émis l'hypothèse que la sPLA2-IIA était impliquée dans ce processus de par sa sélectivité d'action.

Nous avons montré que la sPLA2-IIA est produite en quantité supérieure dans les poumons de patients MV, indépendamment de la mutation du CFTR. De plus, la sPLA2-IIA présente dans les expectorations est active contre *S. aureus* mais pas contre *P. aeruginosa*. Le modèle murin *in vivo* a permis de mettre en évidence sa sélectivité d'action. Le modèle *in vivo* du cobaye nous a permis de démontrer le rôle inducteur de *P. aeruginosa* sur l'expression de la sPLA2-IIA et l'augmentation de la clairance de *S. aureus*. Enfin, nous avons pu déterminer *in vitro* en utilisant des cellules primaires MV ou une lignée cellulaire MV, que *P. aeruginosa* induisait l'expression de la sPLA2-IIA *via* son système de sécrétion de type III et plus particulièrement grâce au domaine ADPRT de la toxine ExoS. Ce processus implique le facteur de transcription KLF2.

Dans cette étude, nous avons montré le rôle physiopathologique de l'activité bactéricide de la sPLA2-IIA dans le contexte de la mucoviscidose. Ces données permettent de mieux comprendre les mécanismes de colonisation bactérienne dans les voies aériennes des patients MV et mettent en évidence un nouveau mécanisme, où une bactérie manipule l'immunité innée afin d'éliminer une autre bactérie.

***Pseudomonas aeruginosa* eradicates *Staphylococcus aureus* by manipulating
the host immunity**

Erwan PERNET^{1,2,3}, Laurent GUILLEMOT^{1,2}, Pierre-Régis BURGEL⁴, Clémence
MARTIN⁴, Gérard LAMBEAU⁵, Isabelle SERMET-GAUDELUS⁶, Dorota SANDS⁷,
Dominique LEDUC^{1,2}, Philippe MORAND⁸, Louise Jeammet⁵, Michel CHIGNARD^{1,2},
Yongzheng WU^{1,2*\$} Lhousseine TOUQUI^{1,2*\$}

1. Unité de défense innée et inflammation, Institut Pasteur, Paris, France

2. INSERM U874, Paris, France

3. Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

4. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; Service de Pneumologie, Hôpital Cochin, AP-
HP, Paris, France

5. Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, UMR 7275 Centre National de la Recherche Scientifique et
Université de Nice Sophia Antipolis, Sophia Antipolis, Valbonne, France

6. INSERM U 806, Université René Descartes, CRCM, Service de Pneumo-Pédiatrie, Hôpital Necker-Enfants
Malades, Paris, France.

7. Institute of Mother and Child, CF Centre, Warsaw, Poland

8. Service de Bactériologie, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité Hôpital
Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

* Corresponding authors: Unité de defense innée et inflammation / INSERM U874,

Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Tel:

+33(0)145688684/+33(0)145688683; Fax: +33 (0)145688703; Email:

lhousseine.touqui@pasteur.fr; yongzheng.wu@pasteur.fr

\$ These authors jointly supervised the work.

ABSTRACT

Young cystic fibrosis (CF) patients' airways are mainly colonized by *Staphylococcus aureus* while *Pseudomonas aeruginosa* predominates in adults. However, the mechanisms behind this infection switch are unclear. Here we show that levels of type-IIA secreted phospholipase A2 (sPLA2-IIA, a host enzyme with bactericidal activity) increase in expectorations of CF patients in an age-dependent manner. These levels are sufficient to kill *S. aureus* with marginal effects on *P. aeruginosa* strains. *P. aeruginosa* laboratory strains and isolates from CF patients induce sPLA2-IIA expression in bronchial epithelial cells from CF patients (these cells are a major source of the enzyme). In an animal model of lung infection, *P. aeruginosa* induces sPLA2-IIA production that favors *S. aureus* killing. We suggest that sPLA2-IIA induction by *P. aeruginosa* contributes to *S. aureus* eradication in CF airways. Our results indicate that a bacterium can eradicate another bacterium by manipulating the host immunity.

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a lethal autosomal, recessive inherited disease that commonly affects Caucasians^{1, 2}. This disease is due to mutation of CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene^{3,4} that encodes a protein channel in epithelial cells where it regulates the luminal secretion of chloride and water transport. The F508del-CFTR is the most frequent mutation in CFTR present in CF patients⁵. Pulmonary disease in CF is the major problem which determines the life span and life quality of patients⁶ and contributes to 80-95% death of CF patients^{7, 8, 9}. In the lungs, mutations of CFTR cause depletion of airway surface liquid and mucus dehydration, which provide appropriate niche for chronic bacterial infection by opportunistic pathogens. Bacterial airways infection varies significantly with the age of patients and *Staphylococcus aureus* (SA) is the most commonly isolated bacterium from young CF patients^{10, 11, 12}. With the increase of age of patients, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) becomes predominant and in the adult patients represents over 80% of bacteria in the lung^{8, 12, 13}. However, the mechanisms responsible for this age-related infection switch from SA to PA remained unclear.

We hypothesized that a selective elimination of SA in CF airways by a host molecule endowed with antibacterial activity might be involved in the infection switch from SA to PA. According to our hypothesis, the levels of this molecule would increase with age of CF patients and PA infection leading to progressive elimination of SA from airways. Among the host molecules endowed with antibacterial properties, antimicrobial peptides (AMPs) play a key role in natural host defense toward invading pathogens^{14, 15, 16}. AMPs are ubiquitous, gene-encoded natural “antibiotics” including cationic peptides, defensins and some secreted phospholipases A2 (sPLA2s)^{14, 17}.

PLA2s represent a superfamily of intracellular and secreted enzymes which hydrolyze membrane phospholipids of eukaryotic and prokaryotic cells¹⁵ and participate in a variety of processes such as inflammation and host defense mechanisms¹⁸. Among mammalian PLA2s, type-IIA secreted PLA2 (sPLA2-IIA) has been shown to exert a potent bactericidal effect^{14, 19}. Gram-positive bacteria are much more sensitive to sPLA2-IIA than Gram-negative bacteria due to higher affinity of sPLA2-IIA to the cell walls of Gram-positive bacteria^{14, 17}. Selective hydrolysis of bacterial membrane phospholipids represents the critical step of bactericidal action of sPLA2-IIA²⁰. This enzyme is the most potent bactericidal agent produced by mammals¹⁷ and is, for example the principal bactericidal molecule for SA in human tears²¹.

Here, we show that sPLA2-IIA is present in expectorations of CF patients at levels sufficient to kill SA with a limited effect on PA. The levels of enzyme increase with the age of CF patients. Both clinical isolates of SA freshly collected from CF patients and SA laboratory strains are killed efficiently by recombinant human sPLA2-IIA (rhsPLA2-IIA). However, this enzyme have a limited effect on PA from both laboratory strains and isolates collected from CF and non-CF patients. Most importantly, we find that PA (laboratory strains and CF isolates), but not SA, induce sPLA2-IIA expression by bronchial epithelial cells (BECs) obtained from CF patients. Using bacterial mutants, we show that the secreted toxin ExoS is the PA virulence factor involved in the induction of sPLA2-IIA expression by BECs. Studies on animal models of airways co-infection by SA and PA demonstrate the role of sPLA2-IIA in the selective airways clearance of SA compared to PA. The presence of PA in airways enhances SA clearance by increasing sPLA2-IIA production. This work thus provides a patho-physiological significance for the selectivity of sPLA2-IIA

bactericidal effect toward the Gram-positive bacteria. It also indicates that a bacterium can eradicate another bacterium by manipulating the innate immunity of the host.

RESULTS

sPLA2-IIA levels in CF airways are sufficient to kill SA

Given that sPLA2-IIA is known to exert potent bactericidal effects against Gram-positive bacteria^{14, 17}, we examined at first the presence of this enzyme in the expectorations from CF patients. It is not possible to obtain sputum from healthy individuals. Expectorations are produced only under particular pathological conditions such as CF. Our data showed that sPLA2-IIA was present in CF expectorations and its levels significantly increased with the age of patients, reaching a plateau near the age of 15-20 years (Fig. 1a, Supplementary Fig. 1a). As expected, IL8 and IL1 β were also detected in CF expectorations (Supplementary Fig. 1b, c). A weak negative correlation was observed between sPLA2-IIA and IL8 and no correlation was observed between sPLA2-IIA and IL1 β levels (Supplementary Fig. 1d, e).

We next examined the ability of sPLA2-IIA contained in CF expectorations to kill SA and PA. Our studies showed that patients' expectorations killed SA with higher efficiency than PA and that SA killing was inhibited by pretreating expectorations with the sPLA2 inhibitor YM26734 (Fig. 1b). These findings were confirmed using a more specific sPLA2-IIA inhibitor RO032007A²² and a sPLA2-IIA neutralizing antibody²³ (which led to total abolition of SA killing by expectorations (Supplementary Fig. 2a)). We also searched for the presence of other sPLA2s in CF expectorations by TRFIA method²⁴. We detected only sPLA2-IIA and sPLA2-X (Supplementary Fig. 2b). However, sPLA2-X levels were not sufficient to kill SA as determined *in vitro* (500ng/ml) (Supplementary Fig. 2c). Finally, we tested the bactericidal activity of sPLA2-V and sPLA2-XIIA toward SA. The results showed no killing activity with these sPLA2 (Supplementary Fig. 2c).

We also showed that these expectorations were able to hydrolyze SA membrane phospholipids and that this hydrolysis was blocked by pretreating expectorations with YM26734 (Fig. 1c). However, no significant PA membrane phospholipids hydrolysis was observed with these expectorations (Fig. 1c). These data indicated that sPLA2-IIA present in CF expectorations was involved in the killing of SA *via* hydrolysis of SA membrane phospholipids, with only marginal effect on PA.

Therefore, we searched for the source of sPLA2-IIA in lungs of CF patients by using immunohistochemistry on lung explants from 10 non-CF and 9 CF patients. All CF patients were infected with PA (Supplementary Table 1). Non-CF patients are non-smoking individuals undergoing lung resection for peripheral lung cancer. It is not possible to obtain bronchial explants from non-infected CF patients because only CF patients with worsen conditions (high infectious status) are admitted for lung transplantation. A marked immunostaining of sPLA2-IIA was observed in all sections of bronchial explants from CF compared with non-CF patients (Fig. 1d, e). Positive staining was observed in surface of airway epithelial cells (Fig 1d, black arrows). Infiltrating neutrophils were also positively stained in explants of CF patients but were virtually absent in explants of non-CF patients (Fig 1d, red arrow).

SA isolates of CF patients are killed by sPLA2-IIA

We next compared the bactericidal effect of rhsPLA2-IIA on clinical isolates and laboratory strains of SA and PA *in vitro*. Remarkably, sPLA2-IIA killed efficiently all SA isolates collected from CF patients without significant effects on PA isolates (Fig. 2a, b). When testing laboratory strains, high concentrations (up to 10 µg/ml) of rhsPLA2-IIA had only marginal bactericidal effect on all tested PA strains (Supplementary Fig. 3a). However, sPLA2-IIA killed all tested SA laboratory strains

with an $EC_{50} \leq 50$ ng/ml (Supplementary Fig. 3b). This EC_{50} value was near sPLA2-IIA levels detected in CF expectorations (around 40 ng/ml, Fig. 1a). Similar bactericidal effect was observed when rhsPLA2-IIA was incubated with SA/PA mixed suspension (Supplementary Fig. 3c). We next examined the mechanisms by which rhsPLA2-IIA killed SA. Killing of SA was abolished by YM26734 (supplementary Fig. 3d). This enzyme increased hydrolysis of SA membrane phospholipids, which was inhibited by YM26734 (Supplementary Fig. 3e). No significant membrane phospholipids hydrolysis was observed in antibiotics-treated or heat-killed SA, indicating that phospholipids hydrolysis was specifically due to sPLA2-IIA (Supplementary Fig. 3f). On the other hand, only limited hydrolysis of PA membrane phospholipids was observed even with 100 times higher sPLA2-IIA concentrations (Supplementary Fig. 3e).

sPLA2-IIA contributes to airways clearance of SA

We next examined the *in vivo* antibacterial function of sPLA2-IIA using transgenic mice over-expressing human sPLA2-IIA (sPLA2-IIA-Tg)²⁵. Increased levels of sPLA2 activity were found in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) from these mice compared to their littermates c57BL/6 which are naturally deficient for sPLA2-IIA (sPLA2-IIA-Wt)²⁵ (Supplementary Fig. 4a). No mortality was observed in sPLA2-IIA-Tg and sPLA2-IIA-Wt mice infected with SA at doses of 10^6 , 10^7 and 10^8 CFUs (Fig. 3a-c). But, at 10^9 CFUs, sPLA2-IIA-Tg mice exhibited higher survival compared to sPLA2-IIA-Wt mice following SA infection (Fig. 3d). This finding was confirmed with another SA laboratory strain SA25923 (Supplementary Fig. 5). However, at all PA doses used, no significant differences in mortality were observed between sPLA2-IIA-Tg and sPLA2-IIA-Wt mice (Fig. 3a-d). This suggested that sPLA2-IIA protected

mice from SA infection. This protective role was further examined in mice co-infected with SA and PA (10^6 CFUs each). An increased elimination of SA was observed in sPLA2-IIA-Tg mice compared to their littermates, 6 h and 24 h after co-infection (Fig. 3e, f). However, PA was cleared with almost similar velocity in sPLA2-IIA-Wt vs sPLA2-IIA-Tg mice, 6 or 24 h after co-infection (Fig. 3e, f). No significant difference was observed in the extent of lung inflammation without infection between sPLA2-IIA-Wt and sPLA2-IIA-Tg mice, as assessed by analysis of cell number and cytokines levels (Supplementary Fig. 4b-e). Infection by PA increased lung inflammation at similar levels in sPLA2-IIA-Wt and sPLA2-IIA-Tg mice (Supplementary Fig. 4c-e).

PA stimulates sPLA2-IIA production leading to SA killing

We next examined whether endogenously produced sPLA2-IIA exerts a role in SA clearance in airways. Given that mice naturally exhibit very low sPLA2-IIA expression in the lungs^{25, 26}, we used guinea pigs as animal model known to produce high pulmonary levels of sPLA2-IIA^{17, 27}. At first, we examined the effect of PA and SA (5×10^6 CFUs each) on sPLA2-IIA expression in guinea pigs lungs. The results showed that intra-tracheal instillation of PA alone or in combination with SA to guinea pigs increased the levels of sPLA2 activity in BALFs of these animals, while SA had only a limited effect (Fig. 4a). This activity was almost totally abolished by pre-treating BALFs with YM26734 (Supplementary Fig. 6a). Next, guinea pigs were infected intratracheally with PA and SA separately or in combination at various loads and ratio and then bacterial loads were analyzed in BALs 24h after co-infection. At 5×10^6 CFUs of PA and SA (1:1 ratio), SA was almost undetectable (Supplementary Fig. 6b). At 5×10^7 CFUs of PA and SA (1:1 ratio), most animals died within 24 h after co-infection (Supplementary Fig. 6c). In another set of experiments, animals were

infected with 5×10^6 CFUs of PA and 5×10^7 CFUs of SA separately or in combination (1:10 ratio). In these conditions, we observed a significant decrease of SA loads in BALs from animals co-infected with PA compared to BALs from animals infected with SA alone. However, PA loads in BALs were similar in the presence or absence of SA (Fig. 4b).

This prompted us to investigate the effect of these BALFs on the hydrolysis of SA membrane phospholipids, which represents the key step in bacterial killing by sPLA2-IIA. BALFs from guinea pigs infected with PA alone or co-infected with PA and SA induced significant phospholipids hydrolysis of SA membranes, compared to that from non-infected or SA-infected animals (Fig. 4c). This hydrolysis was abrogated by pre-treating BALFs with YM26734 before incubation with SA (Fig. 4c).

In addition, our previous studies have shown that LPS from PA induced an increased production of sPLA2-IIA in guinea pigs lungs^{17, 27}. Here, we incubated SA or PA laboratory strains with lung homogenates from PA LPS-treated guinea pigs. The results revealed a trend of increased SA killing by these homogenates compared to homogenates from saline-treated guinea pigs and addition of YM26734 reduced this killing (Supplementary Fig. 6d). However, no difference was observed in PA killing by lung homogenates from both LPS- and saline-treated- guinea pigs (Supplementary Fig. 6e). Interestingly, intra-tracheal instillation of YM26734 before PA/SA co-infection of guinea pigs significantly increased animal mortality (Fig. 4d). YM26734 alone had no effect on inflammation (Supplementary Fig. 6f) or animal mortality (Supplementary Fig. 6g).

PA induces sPLA2-IIA expression in CF epithelial cells

Our data showing that bronchial epithelial cells (BECs) were a main source of sPLA2-IIA in bronchial explants of CF patients (Fig. 1d) prompted us to examine the effect of PA and SA on sPLA2-IIA expression by the BEC line IB3-1 bearing the F508del-CFTR mutation²⁸. All tested PA strains significantly induced sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells in parallel to IL8 secretion (Fig. 5a, Supplementary Fig. 7a). However, none of tested SA strains stimulated sPLA2-IIA expression (Fig. 5b). Although not all of SA strains induced IL8 secretion, all tested SA strains induced higher levels of IL6 secretion than PA strain PAK, used as control (Supplementary Fig. 7b, c). Similarly, CF clinical isolates of PA also induced sPLA2-IIA expression by IB3-1 cells in contrast to SA isolates, which had no effect on its expression (Fig. 5c). As observed with laboratory strains, PA clinical isolates induced IL8 secretion while SA isolates had limited effect (Supplementary Fig. 7d). But SA isolates increased IL6 production (Supplementary Fig. 7e).

We also investigated whether increase in sPLA2-IIA expression in BECs was due to CFTR mutations using primary BECs (pBECs) from 3 different CF and non-CF patients. In basal conditions, pBECs from both CF and non-CF patients had no detectable sPLA2-IIA expression (Fig. 5d). However, this expression increased after PA infection but its levels remained similar in both cells types (Fig. 5d). This suggested that, in primary CF BECs, CFTR mutations have no effect on sPLA2-IIA expression that was clearly induced by PA infection.

PA induces sPLA2-IIA expression *via* T3SS-dependent process

We then searched for the virulence factors of PA involved in sPLA2-IIA expression by BECs. LPS, HSL, CpG, pili and flagellin had no effect on sPLA2-IIA expression and only flagellin induced IL8 secretion by these cells (Fig. 5e, Supplementary Fig. 7f).

Interestingly, the PAK mutant $\Delta pscF$, lacking the type-3 secretion system (T3SS), induced sPLA2-IIA expression at much lower levels compared to the parent strain PAK (Fig. 5f). By contrast, the T2SS mutant ($\Delta xcpQ$) induced this expression at similar levels compared to PAK (Fig. 5f). Deletion of T3SS but not T2SS increased IL8 secretion compared to parent strain (Supplementary Fig. 8a). In subsequent studies, the effect of PA and SA on sPLA2-IIA expression was examined in pBECs isolated from CF patients. As observed in IB3-1 cells, PAK strain induced significant sPLA2-IIA production by pBECs, whereas SA Newman strain had no effect on this production (Fig. 5g). Here again, the T3SS-deficient strain induced sPLA2-IIA production at lower levels compared to parent PAK wild type strain, but induced similar IL8 secretion (Fig. 5g, Supplementary Fig. 8b).

PAK strain of PA is known to inject 3 different toxins (ExoS, ExoT and ExoY) into host cells through T3SS²⁹. Thus, the identification of T3SS as the virulence factor inducing sPLA2-IIA expression by PA allowed us to search which toxin mediated this expression. Our findings showed that among the toxins, ExoS played a key role in sPLA2-IIA expression. Indeed, the ExoS-deficient mutant of PAK ($\Delta exoS$) induced much lower sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells (Fig. 5h), but induced higher IL8 secretion (Supplementary Fig. 8c) compared to the parent strain and the mutants deficient for other toxins ExoT ($\Delta exoT$) and ExoY ($\Delta exoY$). ExoS is a bifunctional toxin displaying 2 enzymatic domains: GTPase Activating Protein (GAP) and ADP-ribosyltransferase (ADPRT)³⁰. In order to distinguish which enzymatic domain was involved in sPLA2-IIA expression, we used the PA strain PA103 $\Delta exoU\Delta exoT$ in which a plasmid containing wild type or mutant of ExoS toxin has been introduced³¹. Our data showed that the ExoS toxin lacking ADPRT (ADPRT⁻), but not GAP activity

(GAP⁻), failed to induce sPLA2-IIA expression compared to the wild type toxin (ExoS⁺)(Fig. 5i).

KLF2 is a key factor in ExoS-induced sPLA2-IIA expression

We finally investigated the signaling pathways by which ExoS induced sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells. Our studies showed that pharmacological inhibition of NF- κ B (MG-132 inhibitor) and AP-1 (SR-11302 inhibitor) had no effect on PAK-induced sPLA2-IIA expression (Fig. 6a) but decreased IL8 secretion induced by PA (Supplementary Fig. 8d). This prompted us to pursue other transcription factors that could be involved in ExoS-induced sPLA2-IIA expression. Krüppel-Like Factor 2 (KLF2) is a transcription factor known to be induced by bacterial toxins and to modulate host immune functions³². Our results showed that PAK stimulated KLF2 expression in IB3-1 cells and that deletion of ExoS from PAK strain markedly reduced this expression (Fig. 6b). However, deletion of ExoT and ExoY had no effect on KLF2 expression (Fig. 6b). Interestingly, gene silencing of KLF2 in IB3-1 cells decreased PAK-induced sPLA2-IIA expression (Fig. 6c, d).

DISCUSSION

Chronic bacterial infections of CF airways, in addition to recurrent lung inflammation, are major causes of morbidity and mortality of CF patients. In most cases, SA colonizes airways of young CF patients while PA predominates in those of adult patients^{10, 11, 12}. A number of hypotheses have been proposed to explain the elimination of SA from airways of CF patients^{33, 34, 35, 36}. However, the pertinence of these hypotheses remained elusive, probably due to the complexity of CF infection and the lack of relevant animal models. The present work suggests that sPLA2-IIA, a host enzyme endowed with potent bactericidal activity, participates in SA elimination from CF airways. We showed the presence of this enzyme in CF expectorations and an increase of its levels with the age of patients. We also demonstrated that sPLA2-IIA levels in CF expectorations were sufficient to kill SA without significant effect on PA. We suggest that PA infection enhances sPLA2-IIA production, which in turn participate to SA elimination in CF airways.

The apparent age-related increase of sPLA2-IIA levels in CF expectorations was dissociated from the evolution of airways inflammation of CF patients. In contrast to sPLA2-IIA levels, those of cytokines did not increase with the age of the patients. This might be explained by the fact that both SA and PA induced airway inflammation whereas only PA stimulated sPLA2-IIA production. Although it is not possible to establish a direct causal relationship between sPLA2-IIA levels and PA infection in CF expectorations, our studies with animal models and cell cultures suggest a role for PA in the induction of sPLA2-IIA production in CF airways. Thus, the observed age-dependent increase of sPLA2-IIA levels in CF expectorations is likely due to the progressive airways infection by PA rather than to the age of patients. Our *in vitro*

studies are in agreement with the dissociation between inflammation and sPLA2-IIA expression. Indeed, flagellin from PA efficiently induced IL8 production, but did not stimulate sPLA2-IIA expression by BECs. Moreover, compared to the PAK parent strain, the T3SS ($\Delta pscF$) and ExoS ($\Delta exoS$) mutants were less efficient in inducing sPLA2-IIA expression but stimulated significantly IL8 production. In addition, SA isolates from CF patients induced IL6 production with a higher potency compared to PA isolates, but failed to stimulate sPLA2-IIA expression in BECs. These findings suggest that sPLA2-IIA expression and cytokine production are probably induced by different mechanisms in CF airways.

Although sPLA2-IIA has been shown to kill preferentially Gram-positive compared to Gram-negative bacteria^{17, 37} [ENREF 18](#), the bactericidal effect of this enzyme on clinical isolates collected from infected CF patients have been poorly investigated. Previous studies showed that rhsPLA2-IIA was able to kill SA and PA clinical isolates collected from CF patients with almost similar efficiency³⁸. However, in those studies high (non-physiological) rhsPLA2-IIA concentrations ($> 8 \mu\text{g/ml}$) have been used thus making it difficult to examine the selectivity of rhsPLA2-IIA action on SA vs PA isolates. In the present work we used concentrations of rhsPLA2 ranging from 10 ng/ml to 10 $\mu\text{g/ml}$, which allowed us to establish the discriminative action of sPLA2-IIA on SA compared to PA isolates. The results showed that sPLA2-IIA concentrations from 10 to 100 ng/ml (which are close to those detected in CF expectorations) were able to kill almost all SA isolates. However, PA isolates are resistant to sPLA2-IIA action even to 10 times higher concentrations. It should also be mentioned that laboratory strains and clinical isolates of SA were killed at similar sPLA2-IIA concentrations suggesting that the bacterial phenotypic changes occurring

in CF airways, with chronic infection, does not modify the sensitivity of these bacteria to sPLA2-IIA action.

Our studies showed that although sPLA2-IIA is detected in most of CF expectorations, SA is still present in some expectorations. It is likely that the sPLA2-IIA levels in airways of certain CF patients are not sufficient to totally eliminate SA. It is also possible that part of SA colonies in CF airways resist somehow to sPLA2-IIA action. Indeed, Koprivnjak *et al.*, previously showed that mutation of SA wall teichoic acid conferred resistance to sPLA2-IIA activity³⁹.

A number of direct and indirect evidences of the present work suggest that PA promotes SA elimination from airways *via* a sPLA2-IIA-dependent mechanism. Indeed: i) PA but not SA infection, induced sPLA2-IIA expression in lungs and isolated airways epithelial cells, ii) sPLA2-IIA killed SA much more efficiently than PA both *in vitro* and in animal models of co-infection by these bacteria, iii) airways produced sPLA2-IIA in response to PA infection to promote the killing of SA and/or alteration of its membrane integrity. In these studies almost identical findings were observed with either laboratory strains or clinical isolates of PA and SA. The sPLA2-IIA bactericidal role was also supported by the fact that transgenic mice over-expressing human sPLA2-IIA cleared more efficiency SA than PA and exhibited higher survival compared to their littermates after pulmonary infection with SA but not PA. In agreement with this capacity, a sPLA2-IIA inhibition increased guinea pigs mortality by pulmonary co-infection with PA and SA.

Our studies showed that BECs, known to play key role in CF pathogenesis, are a major cell source of sPLA2-IIA in CF airways. Indeed, we observed a marked positive

staining of sPLA2-IIA in airway epithelial cells in all sections of bronchial explants from CF patients at significantly higher intensity compared to non-CF bronchial explants. The sPLA2-IIA staining was also detected in infiltrating neutrophils. Similar observation has been previously reported, but this remained controversial^{40, 41}. sPLA2-IIA is stored in granules of neutrophils but this may also reflect the phagocytosis of extracellular sPLA2-IIA associated with bacteria. It was not possible to obtain explants from non-infected CF patients to assay whether increased sPLA2-IIA expression resulted from CFTR mutation and/or PA infection. However, our *in vitro* studies showed that sPLA2-IIA was not constitutively expressed in primary BECs (pBECs) from CF and non-CF patients. This expression increased after PA infection but its levels remained similar in CF and non-CF pBECs. This suggested that CFTR mutations have no effect on sPLA2-IIA expression that is clearly induced by PA infection (Fig. 5d). We propose that in CF context, CFTR mutations facilitated PA airways colonization, which in turn induced sPLA2-IIA expression by host cells.

These data contrasted with those of our previous studies with cell lines in which we showed that CF cell lines produced more sPLA2-IIA than non-CF cell lines either at baseline and after stimulation⁴². This is not surprising as, in general, cell lines are known to differ markedly from corresponding primary cells in their metabolism and response to exogenous stimuli.

We identified for the first time the T3SS as a major virulence factor involved in this induction. The T3SS is a secretion apparatus used by PA to inject effector proteins into host cells and to establish infection⁴³. It allows injection of toxins (ExoS/T/Y/U) endowed with different biological activities that interfere with a number of signaling pathways of host cells³⁰. Interestingly, it has been shown that T3SS expression is

lost in chronically infected CF patients^{13, 29} [ENREF 40 ENREF 14](#). However, other studies reported that up to 29~41 % of PA strains from chronically infected CF patients still expressed the T3SS^{44, 45}. In addition *exoS* gene was detected in all PA isolates from CF patients examined.

Our work also highlighted the role of KLF2 transcription factor in PA-induced sPLA2-IIA expression. This transcription factor, also called lung KLF (LKLF), belongs to the SP-1 zinc-finger transcription factor⁴⁶. KLF2 exerts an anti-inflammatory activity in endothelial cells, monocytes and epithelial cells^{47, 48, 49}. Our studies report for the first time the implication of a transcription factor of the KLF family in sPLA2-IIA transcription. In line with our results, PA infection of CF BECs increased KLF2 expression in an ExoS-dependent manner³². Other bacterial species also enable to induce KLF2 expression^{50, 51}. Although the mechanism by which ExoS induces KLF2 expression is still unclear, our studies suggest that this induction is independent of RhoA, a potential target suggested by others⁵⁰. Indeed, ExoS is a bifunctional toxin with 2 enzymatic domains, GAP and ADPRT³⁰, and only the GAP domain is responsible of RhoA inactivation⁵². Our data showed that the ADPRT, but not the GAP domain, is involved in ExoS-induced sPLA2-IIA expression. In addition, deletion of *ExoT*, which also displays GAP domain, failed to modulate sPLA2-IIA expression. Although the mechanisms that may explain the inability of SA to induce sPLA2-IIA expression are still unknown, it is clear that this inability was not due to a failure of this bacterium to stimulate host cells. Indeed, at MOI that fully stimulated cytokines production, SA was unable to induce sPLA2-IIA expression by BECs. It remains to be investigated whether the inability to stimulate sPLA2-IIA expression is a general property of Gram-positive bacteria. Given that Gram-positive bacteria are in general highly sensitive to sPLA2-IIA bactericidal effects (compared to Gram-negative

bacteria), the inability to induce the production of sPLA2-IIA by Gram-positive bacteria may represent an evolutionary adaptation to escape sPLA2-IIA bactericidal action and to colonize the host.

In conclusion, our findings suggest that sPLA2-IIA participates to the progressive elimination of SA from CF airways. We propose that PA colonization improves this elimination by increasing sPLA2-IIA expression of airways cells. In agreement, previous studies showed that sPLA2-IIA is present in human and animal biological fluids or cell supernatants at sufficient levels to kill bacteria^{21, 53, 54, 55, 56}. AMPs such as LL-37 have also been shown to play a role in pulmonary host defense toward SA and PA in CF lungs⁵⁷, although the anti-microbial activity of these AMPs is impaired in CF airways^{57, 58, 59}. In addition, to our knowledge among all AMPs and sPLA2s reported in literatures, sPLA2-IIA displays the most potent and selective bactericidal action toward Gram-positive bacteria, such as SA.

We should, however, keep in mind that, in addition to sPLA2-IIA, other processes might also potentially contribute to the age-dependent decrease of SA loads in CF airways^{33, 34, 35, 36}. Thus, sPLA2-IIA can be considered as a part of complex process involved in the selective elimination of SA from CF airways. Most importantly, the present work indicates that one bacterium can kill another one by manipulating the innate immunity of the host. This opens new area of research to investigate the role of host antimicrobial molecules in the dynamic of microbiota.

METHODS

Bacterial preparations:

Pseudomonas aeruginosa (PA) strains PAO1, CHA, PAK WT and PAK mutants $\Delta mucA$, $\Delta pscF$ and $\Delta xcpQ$ were kindly provided by Dr. Reuben Ramphal (University of Florida, Gainesville, FL, USA). Pr. Eric Pearlman (Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA) kindly provided PAK WT, $\Delta exoS$, $\Delta exoT$ and $\Delta exoY$ strains. PA103 $\Delta exoU\Delta exoT$ supplemented with pUCP empty vector or containing gene encoding for ExoS WT toxin or mutants{Rocha, 2003 #486} were kindly provided by Dr. J. C. Olson (West Virginia University, Morgantown, WV, USA). All *Staphylococcus aureus* (SA) strains used in this study were kindly provided by Dr. Tarek Msadek (Institut Pasteur, Paris, France). Clinical isolates of PA and SA were collected from CF patients (Hôpital Cochin, Paris, France). All the tested PA clinical isolates were positive for *exoS* gene, detected by quantitative PCR using PAK strain (*exoS*⁺) and PA103 (*exoS*⁻) as positive and negative control respectively, following the protocol described by Berthelot et al.⁶⁰. In the present studies, PA PAK strain and SA Newman strain were used unless mentioned in the text. Bacteria were prepared as described previously^{61, 62}. In brief, a single colony was grown overnight in LB medium with agitation at 37°C. The cultured bacterial suspension was further diluted in fresh LB and grown again to reach mid-log phase. After centrifugation (3000g, 15 min at 25°C), bacterial pellet was rinsed and suspended in appropriate volume of PBS. The bacterial concentrations were calculated according to OD value measured at 600 nm and further adjusted to the approximate desired concentration for *in vitro* or *in vivo* experiments.

Cell culture and bacterial infection

Human bronchial epithelial IB3-1 cell line bearing CF mutant F508del/W1282X genotype²⁸, and primary bronchial epithelial cells (pBECs) collected from different CF and non-CF patients and commercially available at Epithelix® (Geneva, Switzerland) were used in the studies. IB3-1 cells cultured in LHC-8 medium (Cat. No. 12678-017, Invitrogen) were seeded in culture dish and incubated with PA and SA (WT and mutants). The plates were centrifuged (500g, 25°C, 5 min) to initiate the infection. One hour later, cells were rinsed 3 times with pre-warmed culture medium containing tobramycin (40 µg/ml) to kill extracellular bacteria and then incubated for additional 24 h in the presence of antibiotic before harvesting cells. Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) preparations of PA (kind gift of Dr. Reuben Ramphal, University of Florida, Gainesville, FL, USA) were also incubated with cells for 24 h in the presence of antibiotic. Primary BECs isolated from CF patients carrying homozygous F508del mutation or from non-CF subjects, were from Epithelix® (Geneva, Switzerland) and cultured in MucilAir® culture medium (Epithelix®) in transwell with air-liquid interface. The cells were infected with bacteria at the apical side for 3 h and then bacteria were removed by rinsing and incubated with PBS-tobramycin (40 µg/ml) for 30 min followed by incubation of the apical pole in air-liquid interface for additional 24 h.

In certain experiments, inhibitor of proteasome/NF-κB (MG-132, 3µM, Cat. No. 474791, Calbiochem, MA, USA) or inhibitor of AP-1 (SR-11302, 1µM, Cat. No. 2476, Tocris, CA, USA) were added 1 hour before infection with bacteria and maintained for overnight incubation.

After reaction, cell-free culture medium were kept at -80°C for further analysis. Cells were harvested for analysis of protein expression (human sPLA2-IIA) using western

blot. IL8 levels in supernatant of culture medium was examined by ELISA (CXCL8/IL8 DuoSet, Cat. No. DY208, R&D systems, MN, USA). Cell cytotoxicity was controlled using lactate deshydrogenase assay (Promega, France) in the culture medium.

RNA interference in IB3-1 cells

Non-specific small interfering RNA (siRNA) (ON-TARGETplus non-targeting control pool, Cat. No. D-001810-10-05) and KLF2 siRNA (smartpool ON-TARGETplus KLF2 siRNA, Cat. No. L006928-00-0005) were commercially available from Dharmacon (Fisher Scientific, Illkirch, France). Subconfluent IB3-1 cells were transfected with siRNA (100nM) using Lipofectamine 2000 (1.5µg/ml, Invitrogen) for 8 hours, before complete medium (LHC-8 supplemented with 5% FCS and penicillin/streptomycin 100U/ml each) was added. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated in antibiotic- and serum-free LHC-8 medium until infection.

***In vitro* killing studies**

Recombinant human sPLA2-IIA (rhsPLA2-IIA, prepared by Dr. Gerard Lambeau, Université de Nice Sophia Antipolis, Sophia Antipolis, Valbonne, France) was used in the present studies. Bacteria (10^5 CFU/ml) were incubated with or without rhsPLA2-IIA in the reaction buffer (0.1 M Tris pH8.0, 1mM CaCl₂ and 0.1% fatty acid-free BSA) at 37°C. Two hours later, bacterial suspension was serially diluted with PBS and aliquots were streaked on LB-agar plate and incubated 24 h at 37°C. Bactericidal effect of rhsPLA2-IIA was checked by counting bacterial colonies on the plates and expressed as percentages of CFU compared to that of treatment without sPLA2-IIA. In certain experiment, recombinant protein was pre-incubated with its specific

inhibitors, YM26734 (10 μ M, Cat. No. 2522, Tocris, CA, USA), RO032007A (10 μ M, kind gift of Pr. Michael Gelb, University of Washington, Seattle, WA, USA)²³ or specific neutralizing antibody (nAB, 10 μ g/ml, prepared by Dr. Gerard Lambeau)²⁴ for 30 min before incubation with bacteria.

Bacterial membrane hydrolysis analysis

Bacteria were prepared as described above except that next morning diluted bacterial suspension was grown to mid-log phase in the presence of ³H-oleic acid (³H-OA) (Cat. No. NET289, NEN Radiochemicals). This allowed labeling of bacterial membrane phospholipids⁵⁵. After centrifugation (3000 g, 25°C, 15 min), bacterial pellets were suspended in 5 ml of LB medium and incubated for additional 30 min to allow binding of oleic acid on the surface of bacteria to be incorporated, followed by rinsing once using 0.15 M NaCl to remove non-incorporated ³H-OA. The desired inoculum (10⁸ cfu/ml/reaction) suspended in assay buffer (0.1M Tris pH8, 1mM CaCl₂ and 0.1% fatty acid-free BSA) was then incubated for 2 h at 37°C with rPLA2-IIA, bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from bacteria-infected guinea pigs (see protocol below) or supernatants of sputum from CF patients (see protocol below). After reaction, the released free ³H-OA in supernatant (centrifugation at 13000 g for 1 min) was monitored using scintillation counting. The levels of ³H-OA contained in aliquots of bacterial suspension or centrifuged supernatant from control groups (bacteria were incubated with PBS), were defined as total and blank (non-specific) count, respectively. In certain experiments, samples were pre-treated with the sPLA2 inhibitor YM26734 (10 μ M) for 30 min before incubation with bacteria. The results were presented as percentage of released free ³H-OA from total incorporated ³H-OA by bacteria.

Studies of airways bacterial clearance and animal survival

Animals were housed in the Institut Pasteur animal facilities accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on live rodents. Work on animals was performed in compliance with French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 2010/63, French Law 2013-118, February 6th, 2013). All experiments were approved by the Ethics Committee #89 and registered under the reference 2014-0014. Transgenic mice over-expressing human sPLA2-IIA (sPLA2-IIA-Tg) were from Taconic (Denmark) and generated by inserting 6.2kb full length of human sPLA2-IIA gene into mouse genome and bred to c57BL/6 mouse²⁵. The corresponding littermates (sPLA2-IIA-Wt) with c57BL/6 genetic background were natural sPLA2-IIA-deficient mouse due to frameshift mutation of this gene⁶³. Mice (males and females, 7-9 weeks) were bred in our animal facility and infected intratracheally with PA and/or SA (10^6 , 10^7 , 10^8 or 10^9 CFUs) suspended in 50 μ l of PBS as indicated in legend. Mice mortality was monitored up to 180 h. In certain experiments 6 or 24 h after infection with PA and/or SA, lung homogenates were prepared as described previously⁶⁴ and bacterial loads in the lung were examined by checking bacterial CFUs in lung homogenates on LB-agar plate. The bacterial loads in the lung were expressed as CFU/ml lung homogenate.

Male Hartley guinea pigs (~2-3 weeks old, 150 g, purchased from Charles River, France) were also infected by PA and/or SA (suspended in 100 μ l of PBS) in this study. Bacterial load in the lungs were evaluated by checking bacterial CFUs in BALs 24 h after infection. In some experiments 24 and 1 h before bacterial infection, the sPLA2 inhibitor YM26734 (2 mg/kg body weight, 4 mM in DMSO) or vehicle (DMSO) was introduced by intravenous injection and the third dose was given by intra-

tracheal instillation together with bacterial preparations. Animal survival was monitored for 24 h. sPLA2 activity in BALF was examined 24 h after infection.

For killing assay with lung homogenates, 100µl of PBS or LPS (300µg/kg body weight) were instilled intratracheally to guinea pigs. Twenty-four hours later, lungs were harvested and homogenized in PBS using Lysing matrix D (MPbiomedicals, Illkirch, France). Then, 90 µl of lung homogenates were incubated with bacteria (10^5 /ml) in reaction buffer (0.1M Tris pH8, 1mM CaCl₂ and 0.1% fatty acid-free BSA) for 2 hours, before CFU counting by streaking on agar plates. When indicated, homogenates were pre-treated with the sPLA2 inhibitor YM26734 (10 µM) for 30 min before incubation with bacteria.

Sputum treatment

All sputum samples from CF patients were collected in accordance with the guidance of European Union and the local Committees on Human Research CPP Ile-de-France 1 and registered under the reference 2013-Nov.-13406. Informed consent was obtained for all patients. We did not share personal information of patients according to privacy policy. The collected sputum was firstly diluted in PBS (1:1 vol) and homogenated with repeated vigorous agitation. To decrease the viscosity of samples due to large amounts of DNA and F-actin present in expectorations^{65, 66}, an aliquot (200 µl) of mixed suspension was treated with recombinant bovine DNase I (10 units, Roche) for 1 h at 37°C with up-down rotation. After reaction the supernatants were harvested by centrifugation (14000 g at 4°C for 10 min) and further irradiated in dry ice using a ¹³⁷Cs-source γ-irradiator (IBL 637, CIS bio international) to kill bacteria in sputum, which was verified by streaking aliquot of

sample on LB-agar plate and checking bacterial colonies. The samples were then kept at -80°C for further analysis.

sPLA2 activity and EIA assay

The sPLA2 activity in BALF as well as supernatants of expectorations was measured using ³H-OA labeled *E. coli* membrane phospholipids as substrate^{67, 68}. In brief, aliquots of BALFs or supernatants of expectorations (1~10 µl) were incubated with 10 µl substrate (containing around 6000 cpm) at 37°C in assay buffer (0.1M Tris pH7.5, 1mM CaCl₂, 0.2% sodium azide) with 200 µl of total volume. Thirty minutes later, the reactions were stopped by adding 100 µl of stop buffer (0.25% BSA in assay buffer, pH7.5) followed by centrifugation (1800g at 4°C for 10 min). The sPLA2 activity was presented as percentage of radioactivity in the supernatant compared to that of total count (defined as radioactivity detected in mixed suspension of substrate incubated with PBS). The specificity of this activity assay was verified in the presence of selective sPLA2 activity inhibitor, YM26734 (10 µM) which was pre-incubated with sample for 30 min before adding substrate.

The quantification of specific sPLA2-IIA protein in the patients' expectoration was performed using a commercial enzyme immunoassay kit (EIA kit, Cat. No. 585000, Cayman Chemical, MI, USA) according to manufacturer's instruction.

Analysis of sPLA2-IIA and KLF2 expression and cytokines

TNF α , KC and IL6 levels in BALFs of sPLA2-IIA-Wt and sPLA2-IIA-Tg mice were measured with mouse TNF-alpha DuoSet (Cat. No. DY410), mouse CXCL1/KC DuoSet (Cat. No. DY453) and mouse IL-6 DuoSet (Cat. No. DY406) ELISA kits from R&D Systems, respectively. IL8 secretion in cell-free culture medium from human CF

epithelial IB3-1 cells, basal pole medium of primary epithelial cells and supernatant of patients' sputum, was examined using commercial kit human CXCL8/IL8 DuoSet (Cat. No. DY208) from R&D systems (MN, USA). IL6 and IL1 β production were also examined in some experiments using human IL-6 DuoSet (Cat. No. DY206) and human IL-1 beta/IL1-F2 DuoSet (Cat. No. DY201) ELISA kits from R&D system. sPLA2-IIA expression in these human cells was analyzed by western blot. In brief, total proteins were extracted from IB3-1 and primary BECs after incubation with bacteria or bacterial PAMPs preparations. After SDS-PAGE electrophoresis and transfer to PVDF membrane, human sPLA2-IIA expression was analyzed by immunoblot using anti-human sPLA2-IIA polyclonal antibody (1 μ g/ml, Cat. No. Ab47105, Abcam, MA, USA). Original full scans are presented in Supplementary Fig. 9.

Total RNA was extracted from IB3-1 cells using RNeasy mini kit (Qiagen, CA, USA) according to manufacturer's instruction. The expression of KLF2 was analyzed by quantitative PCR (qPCR) using 7900HT fast real-time PCR system (Applied Biosystems). The primers used for qPCR were GAPDH (F: AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT, R: CCCCACTTGATTTTGGAGGGA) and KLF2 (F: CCTCCCAAAGTGTGACTGGT, R: ACTCGTCAAGGAGGATCGTG). The qPCR was performed using SYBR green master mix. The results are presented as relative quantification (RQ) of gene expression using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Human lung tissues

Human lung tissues were obtained from 9 non-smoking CF adults at transplantation and from 10 non-smoking Controls undergoing lung resection for peripheral lung cancer. Informations about infectious status of CF patients are provided in

Supplementary Table 1. Lung tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin by inflation-immersion and embedded in paraffin. Studied locations were chosen randomly.

The study conformed to the Declaration of Helsinki and all to the rules of the local Committees on Human Research CPP Ile-de-France 1 and registered under the reference 2013-Nov.-13406. Informed consent was obtained in all patients.

Immunohistochemical staining and morphometric analysis

Immunohistochemical staining was performed on 5 µm paraffin-embedded sections. The sections were deparaffinised, rehydrated and treated with 0.3% H₂O₂ in methyl alcohol⁶⁹. The primary antibody (Ab) raised against sPLA₂-IIA was a rabbit polyclonal Ab (4µg/ml, Cat. No. Ab23705, Abcam, MA, USA) and was diluted in PBS containing 0.05% Tween-20 and 1% bovine serum albumin (BSA). Antigen unmasking by incubation with target retrieval solution RTU (Dako) for 40 min was required to improve the quality of staining. Biotinylated anti-rabbit Ab (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used for secondary Ab, and bound Ab were visualized according to standard protocols for avidin-biotin-peroxidase complex method (Elite ABC kit; Vector Laboratories). Tissue sections were counterstained with haematoxylin. Omission of primary Ab and incubation with irrelevant immunoglobulins were used as negative controls.

Quantification of sPLA₂-IIA epithelial immunostaining was performed by point counting using a grid⁷⁰. Points within the grid falling on epithelial cells staining positively were counted. Volume occupied by sPLA₂-IIA positively-stained cells in epithelium was expressed per volume of epithelium. Analysis was performed on at least twenty randomly-chosen high-magnification (400X) photomicrographs.

Statistical analysis

The results were presented as mean \pm s.e.m. and the data were analyzed using statistic software GraphPad Prism 5.0. The level of statistical significance was determined either by T-test, one-way ANOVA (Newman-Keuls multiple comparisons test or Bonferroni multiple comparisons test) or two-way ANOVA. Survival studies were analyzed by Log-rank test.

REFERENCES

1. Cohen-Cymberknoh M, Shoseyov D, Kerem E. Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 1463-1471 (2011).
2. Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **23**, 299-323 (2010).
3. Kerem B, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073-1080 (1989).
4. Riordan JR, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073 (1989).
5. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* **19**, 575-606 (2002).
6. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med* **18**, 509-519 (2012).
7. George AM, Jones PM, Middleton PG. Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *FEMS Microbiol Lett* **300**, 153-164 (2009).
8. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **24**, 29-70 (2011).
9. Pressler T, *et al.* Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **10 Suppl 2**, S75-78 (2011).
10. Armstrong DS, *et al.* Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 1197-1204 (1997).
11. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **153**, 917-923 (2007).
12. Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest* **136**, 1554-1560 (2009).
13. Folkesson A, *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **10**, 841-851 (2012).
14. Nevalainen TJ, Graham GG, Scott KF. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim Biophys Acta* **1781**, 1-9 (2008).

15. Touqui L, Alaoui-El-Azher M. Mammalian secreted phospholipases A2 and their pathophysiological significance in inflammatory diseases. *Curr Mol Med* **1**, 739-754 (2001).
16. Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* **2**, 727-738 (2004).
17. Wu Y, *et al.* Type-IIA secreted phospholipase A2 is an endogenous antibiotic-like protein of the host. *Biochimie* **92**, 583-587 (2010).
18. Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* **50**, 152-192 (2011).
19. Piris-Gimenez A, *et al.* In vivo protective role of human group IIa phospholipase A2 against experimental anthrax. *J Immunol* **175**, 6786-6791 (2005).
20. Foreman-Wykert AK, Weinrauch Y, Elsbach P, Weiss J. Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria. *J Clin Invest* **103**, 715-721 (1999).
21. Qu XD, Lehrer RI. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* **66**, 2791-2797 (1998).
22. Oslund RC, Gelb MH. Biochemical characterization of selective inhibitors of human group IIA secreted phospholipase A(2) and hyaluronic acid-linked inhibitor conjugates. *Biochemistry* **51**, 8617-8626 (2012).
23. Mover E, Wu Y, Lambeau G, Kahn F, Touqui L, Areschoug T. Secreted group IIA phospholipase A2 protects humans against the group B streptococcus: experimental and clinical evidence. *J Infect Dis* **208**, 2025-2035 (2013).
24. Nevalainen TJ, Eerola LI, Rintala E, Laine VJ, Lambeau G, Gelb MH. Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum. *Biochim Biophys Acta* **1733**, 210-223 (2005).
25. Grass DS, *et al.* Expression of human group II PLA2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *The Journal of clinical investigation* **97**, 2233-2241 (1996).
26. Eerola LI, Surrrel F, Nevalainen TJ, Gelb MH, Lambeau G, Laine VJO. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 745-756 (2006).
27. Arbibe L, *et al.* Endotoxin induces expression of type II phospholipase A2 in macrophages during acute lung injury in guinea pigs: involvement of TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced type II phospholipase A2 synthesis. *J Immunol* **159**, 391-400 (1997).

28. Zeitlin PL, *et al.* A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**, 313-319 (1991).
29. Lee VT, Smith RS, Tummler B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* **73**, 1695-1705 (2005).
30. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* **7**, 654-665 (2009).
31. Rocha CL, Coburn J, Rucks EA, Olson JC. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect Immun* **71**, 5296-5305 (2003).
32. O'Grady EP, Mulcahy H, O'Callaghan J, Adams C, O'Gara F. *Pseudomonas aeruginosa* infection of airway epithelial cells modulates expression of Kruppel-like factors 2 and 6 via RsmA-mediated regulation of type III exoenzymes S and Y. *Infect Immun* **74**, 5893-5902 (2006).
33. Hoffman LR, *et al.* Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19890-19895 (2006).
34. Machan ZA, *et al.* Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: description of an anti-staphylococcal substance. *J Med Microbiol* **34**, 213-217 (1991).
35. Mashburn LM, Jett AM, Akins DR, Whiteley M. *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *J Bacteriol* **187**, 554-566 (2005).
36. Yang L, Liu Y, Markussen T, Hoiby N, Tolker-Nielsen T, Molin S. Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **62**, 339-347 (2011).
37. Nevalainen TJ, Haapamaki MM, Gronroos JM. Roles of secretory phospholipases A(2) in inflammatory diseases and trauma. *Biochim Biophys Acta* **1488**, 83-90 (2000).
38. Dubouix A, *et al.* Bactericidal properties of group IIa secreted phospholipase A(2) against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Med Microbiol* **52**, 1039-1045 (2003).
39. Koprivnjak T, Weidenmaier C, Peschel A, Weiss JP. Wall teichoic acid deficiency in *Staphylococcus aureus* confers selective resistance to mammalian group IIA phospholipase A(2) and human beta-defensin 3. *Infect Immun* **76**, 2169-2176 (2008).
40. Rosenthal MD, Gordon MN, Buescher ES, Slusser JH, Harris LK, Franson RC. Human neutrophils store type II 14-kDa phospholipase A2 in granules and

- secrete active enzyme in response to soluble stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 650-656 (1995).
41. Madsen LM, Inada M, Weiss J. Determinants of activation by complement of group II phospholipase A2 acting against Escherichia coli. *Infect Immun* **64**, 2425-2430 (1996).
 42. Medjane S, Raymond B, Wu Y, Touqui L. Impact of CFTR DeltaF508 mutation on prostaglandin E2 production and type IIA phospholipase A2 expression by pulmonary epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **289**, L816-824 (2005).
 43. Engel J, Balachandran P. Role of Pseudomonas aeruginosa type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* **12**, 61-66 (2009).
 44. Dacheux D, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, Attree I. Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* **68**, 2916-2924 (2000).
 45. Roy-Burman A, et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic Pseudomonas aeruginosa infections. *The Journal of infectious diseases* **183**, 1767-1774 (2001).
 46. McConnell BB, Yang VW. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev* **90**, 1337-1381 (2010).
 47. SenBanerjee S, et al. KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *The Journal of experimental medicine* **199**, 1305-1315 (2004).
 48. Das H, et al. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6653-6658 (2006).
 49. Saavedra MT, et al. Abrogation of anti-inflammatory transcription factor LKLF in neutrophil-dominated airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**, 679-688 (2008).
 50. Dach K, et al. Bacterial toxins induce sustained mRNA expression of the silencing transcription factor klf2 via inactivation of RhoA and RhoG. *Infect Immun* **77**, 5583-5592 (2009).
 51. Zahlten J, et al. TLR2- and nucleotide-binding oligomerization domain 2-dependent Kruppel-like factor 2 expression downregulates NF-kappa B-related gene expression. *J Immunol* **185**, 597-604 (2010).
 52. Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT. The N-terminal domain of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* **274**, 36369-36372 (1999).

53. Gimenez AP, Wu YZ, Paya M, Delclaux C, Touqui L, Goossens PL. High bactericidal efficiency of type iia phospholipase A2 against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin. *J Immunol* **173**, 521-530 (2004).
54. Gronroos JO, Laine VJ, Nevalainen TJ. Bactericidal group IIA phospholipase A2 in serum of patients with bacterial infections. *J Infect Dis* **185**, 1767-1772 (2002).
55. Mover E, Wu Y, Lambeau G, Touqui L, Areschoug T. A novel bacterial resistance mechanism against human group IIA-secreted phospholipase A2: role of *Streptococcus pyogenes* sortase A. *J Immunol* **187**, 6437-6446 (2011).
56. Harwig SS, Tan L, Qu XD, Cho Y, Eisenhauer PB, Lehrer RI. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. *J Clin Invest* **95**, 603-610 (1995).
57. Weiner DJ, Bucki R, Janmey PA. The antimicrobial activity of the cathelicidin LL37 is inhibited by F-actin bundles and restored by gelsolin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 738-745 (2003).
58. Chen CI, Schaller-Bals S, Paul KP, Wahn U, Bals R. Beta-defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **3**, 45-50 (2004).
59. Pezzulo AA, *et al.* Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* **487**, 109-113 (2012).
60. Berthelot P, *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. *J Infect Dis* **188**, 512-518 (2003).
61. Delic-Attree I, Toussaint B, Froger A, Willison JC, Vignais PM. Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in algD gene expression. *Microbiology* **142** (Pt 10), 2785-2793 (1996).
62. Ramphal R, Balloy V, Jyot J, Verma A, Si-Tahar M, Chignard M. Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J Immunol* **181**, 586-592 (2008).
63. Kennedy BP, *et al.* A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *The Journal of biological chemistry* **270**, 22378-22385 (1995).
64. Buff SM, *et al.* IL-10 delivery by AAV5 vector attenuates inflammation in mice with *Pseudomonas pneumonia*. *Gene Ther* **17**, 567-576 (2010).

65. Vasconcellos CA, Allen PG, Wohl ME, Drazen JM, Janmey PA, Stossel TP. Reduction in viscosity of cystic fibrosis sputum in vitro by gelsolin. *Science* **263**, 969-971 (1994).
66. Brandt T, Breitenstein S, von der Hardt H, Tummler B. DNA concentration and length in sputum of patients with cystic fibrosis during inhalation with recombinant human DNase. *Thorax* **50**, 880-882 (1995).
67. Weiss J, Franson C, Schmeidler K, Elsbach P. Reversible envelope effects during and after killing of *Escherichia coli* w by a highly-purified rabbit polymorpho-nuclear leukocyte fraction. *Biochim Biophys Acta* **436**, 154-169 (1976).
68. Paya M, Terencio MC, Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Involvement of secretory phospholipase A2 activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation. *Br J Pharmacol* **117**, 1773-1779 (1996).
69. Burgel PR, Cardell LO, Ueki IF, Nadel JA. Intranasal steroids decrease eosinophils but not mucin expression in nasal polyps. *Eur Respir J* **24**, 594-600 (2004).
70. Martin C, *et al.* CFTR dysfunction induces vascular endothelial growth factor synthesis in airway epithelium. *Eur Respir J* **42**, 1553-1562 (2013).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. R. Ramphal (University of Florida, Gainesville, FL, USA), Dr. T. Msadek (Institut Pasteur, Paris), Pr. E. Pearlman (Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA), Dr. J. C. Olson (West Virginia University, Morgantown, WV, USA), Dr. P. Peris (University of València, Spain), Pr. M. Gelb (University of Washington, Seattle, WA, USA) for providing PA and SA strains as well as substrate for sPLA2 activity assay and RO032007A compound; Dr. C. Schmitt (Hôpital Trousseau, Paris) for providing expectorations of children patients; V. Balloy and M. Nahori (Institut Pasteur, Paris) for technical assistance with intratracheal and intravenous instillation and C. Payre for helpful advices in sPLA2 analyses. This study was supported by France “Vaincre la Mucoviscidose” and “DIM Malinf-Region Ile de France” foundation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.P. and Y.Z.W. designed, performed and analyzed experiments. D.L. and L.G. participated in laboratory, animals and expectorations studies. D.S., P.R.B. and I.S.G. assisted in expectorations studies. C.M and P.R.B performed immunohistochemistry. R.R. and G.L. helped in laboratory studies. M.C. discussed the data at different steps of study and critically reviewed the manuscript. Y.Z.W. and L.T. designed this project and participated in experiments. E.P., Y.Z.W. and L.T. wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: sPLA2-IIA levels in CF airways are sufficient to kill SA.

(a) sPLA2-IIA levels in expectorations at different age groups of CF patients. n indicated the number of patients per age group. n=104 total sputa (b) Bactericidal effect of sPLA2-IIA contained in expectorations against SA (Newman strain) and PA (PAK strain). PA or SA were incubated for 2 hours with CF expectorations, pretreated with or without sPLA2 inhibitor YM26734. Total CFUs were counted by plating on LB agar plates. Killing effect was expressed as percentage-killed bacteria referred to PBS treatment, defined as no killing. n=104 sputa tested in each group. (c) Membrane hydrolysis of ^3H -Oleic Acid-labeled SA (^3H -OA-SA) and PA (^3H -OA-PA) by sPLA2-IIA contained in expectorations of CF patients. The expectorations were pretreated with YM26734 or vehicle before incubation with ^3H -OA-SA or ^3H -OA-PA. n=13 sputa tested per group (d) Airway sections obtained in a Control patient and a CF patient were stained with an antibody raised against sPLA2-IIA (brown color) and counterstained with haematoxylin. In the Control subject, only sparse staining for sPLA2-IIA was present in the epithelium. In the CF patient, extensive staining for sPLA2-IIA was present in epithelium. Photomicrographs were representative of results obtained in 10 Controls and in 9 CF patients. Black arrows: epithelial cells, red arrow: neutrophils. Scale bars = 50 μm . Original magnification: 200 X. (e) Morphometric analysis of sPLA2-IIA immunostaining in the airways of Controls (\square , n=10) and of CF subjects (\blacksquare , n=9). Airway sections were immunostained for sPLA2-IIA. Morphometric analysis was performed using point counting. sPLA2-IIA positively-stained volume in epithelium was significantly higher in CF versus control airways. (P -value=0.006). All data were presented as mean \pm s.e.m.. ** P -value<0.01 *** P -value<0.001 determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple's comparisons test or Student's t-test. ns, no significance.

Figure 2: SA isolates from CF patients are killed by rhsPLA2-IIA.

Bactericidal effect of rhsPLA2-IIA against clinical isolates of SA (a) and PA (b). Newman and PAK were used as reference strains for SA and PA, respectively. Bacteria were incubated with recombinant human sPLA2-IIA (rhsPLA2-IIA, 50ng/ml for SA or 1 μg /ml for PA) or PBS for 2 hours. Total CFUs were quantified by plating on

LB agar plates. Bars graph represent survival of bacteria compared to PBS treatment. Graphs showed results of 5 clinical isolates of SA and PA. All data were presented as mean±s.e.m. from three independent experiments. **** P -value<0.0001 determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple's comparisons test.

Figure 3: sPLA2-IIA protects transgenic mice from SA lung infection.

(a-d) Mortality of transgenic mice over-expressing human sPLA2-IIA (sPLA2-IIA-Tg) and their littermate mice (sPLA2-IIA-Wt) after lung infection with PA or SA at 10^6 (a), 10^7 (b), 10^8 (c) and 10^9 (d) CFUs per mouse ($n \geq 7$ per group). Data were presented as Kaplan-Meier curves. * P -value<0.05 compared to SA-infected sPLA2-IIA-Wt mice (log-rank test). (e-f) Quantification of bacterial colonies in mice ($n \geq 5$ per group) lung homogenates 6 h (e) or 24 h (f) after co-infection with SA and PA. Lung homogenates were plated on LB agar plates for total bacteria quantification. All data in (e, f) were presented as mean±s.e.m.. ** P -value<0.01, *** P -value<0.001 compared to corresponding sPLA2-IIA-Wt mice (two-way ANOVA).

Figure 4: PA-induced sPLA2-IIA participates to SA clearance in airways.

(a) sPLA2 activity assay in BALFs from non-infected (PBS), PA and/or SA infected animals ($n \geq 3$ per group). sPLA2 activity was measured using ^3H -OA labeled *E. coli* membrane as substrate. (b) Bacterial loads in BALs from SA and/or PA intratracheally infected animals ($n \geq 5$ per group). BALs were plated on LB agar plates for CFU counting. (c) Membrane hydrolysis of ^3H -OA-labeled SA (^3H -OA-SA) by sPLA2-IIA contained in BALFs from PBS, PA and/or SA infected animals. BALFs were pretreated with 10 μM YM26734 or vehicle before incubation with ^3H -OA-SA. (d) Effect of YM26734 on mortality of guinea pigs co-infected intratracheally with SA and PA ($n = 3$ per group). Animals were pretreated by YM76234 or vehicle before bacterial infection. Data was presented as Kaplan-Meier curves (* P -value<0.05, Log-rank test). Data in (a-c) were shown as mean±s.e.m.. ** P -value<0.01, *** P -value<0.001 determined by one-way ANOVA, followed by Bonferroni multiple's comparisons test. * P -value<0.05 compared to SA-infected sPLA2-IIA-Wt mice (log-rank test).

Figure 5: PA toxin ExoS stimulates sPLA2-IIA expression in CF epithelial cells.

(a) Western blot analysis of sPLA2-IIA expression in IB3-1 bronchial epithelial cells (BECs) after infection with different strains of PA. (b) Western blot analysis of sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells after infection with different strains of SA. Cells were infected with PAK wild type parental strain as positive control. (c) Western blot analysis of sPLA2-IIA expression in IB3-1 after infection with 5 clinical isolates of PA and SA collected from CF patients, respectively. (d) Western blot analysis of sPLA2-IIA expression in human primary bronchial epithelial cells from 3 different non-CF and CF patients (P1-P3). Cells were either infected with PAK strain (PA) or uninfected. (e) Western blot analysis of sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells after incubation with different preparations of PA PAMPs including LPS, flagellin, pili, CpG and HSL. (f) Western blot analysis of sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells after infection with mutant of PAK deficient for type 3 secretion system ($\Delta pscF$) or type 2 secretion system ($\Delta xcpQ$). Cells were infected with PAK wild type parental strain as positive control. (g) Western blot analysis of sPLA2-IIA expression in primary BECs collected from CF patients after infection with SA, PA and T3SS-deficient strain of PA ($\Delta pscF$). (h) Western blot analysis of sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells after infection with mutants of PAK deficient for toxins ExoS ($\Delta exoS$), ExoT ($\Delta exoT$) and ExoY ($\Delta exoY$). Cells were infected with PAK wild type parental strain as positive control. (i) sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells infected with PA103 $\Delta U\Delta T$ strain in which different mutants of ExoS were introduced: pUCP (empty vector), ExoS⁺ (wild type toxin), GAP⁻ (ExoS mutant in arginine 146), ADPRT⁻ (ExoS mutant in glutamic acid 379 and 381) and double mutant GAP⁻/ADPRT⁻. Immunoblots shown were representative results from at least three independent experiments. Full blots are available in Supplementary Fig. 9.

Figure 6: ExoS-induced KLF2 factor is involved sPLA2-IIA expression.

(a) Western blot showing the effect of NF- κ B (MG-132, 3 μ M) and AP-1 (SR-11302, 1 μ M) inhibition on sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells. (b) KLF2 expression in IB3-1 cells after infection with PAK and toxin-deficient strains ExoS ($\Delta exoS$), ExoT ($\Delta exoT$) and ExoY ($\Delta exoY$). mRNAs were collected after 3h of infection and KLF2 expression

was quantified by RT-qPCR. (c) Silencing of KLF2 expression by specific pool of siRNA (siRNA KLF2) quantified by RT-qPCR, compared to non-specific siRNAs (siRNA Control). (d) Western blot analysis of sPLA2-IIA expression in PAK-infected IB3-1 cells after KLF2 silencing using siRNA. Cells treated by non-specific (siRNA Control) or KLF2 siRNA (siRNA KLF2) were infected by PAK strain for 1 hour and protein were harvested 24 hours later for immunoblotting. Data in b and c were presented as mean \pm s.e.m. from at least three independent experiments. ****P*-value<0.001 determined by one-way ANOVA, followed by Bonferroni multiple's comparisons test. Immunoblots shown were representative results from at least three independent experiments. Full blots are available in Supplementary Fig. 9.

Fig. 1

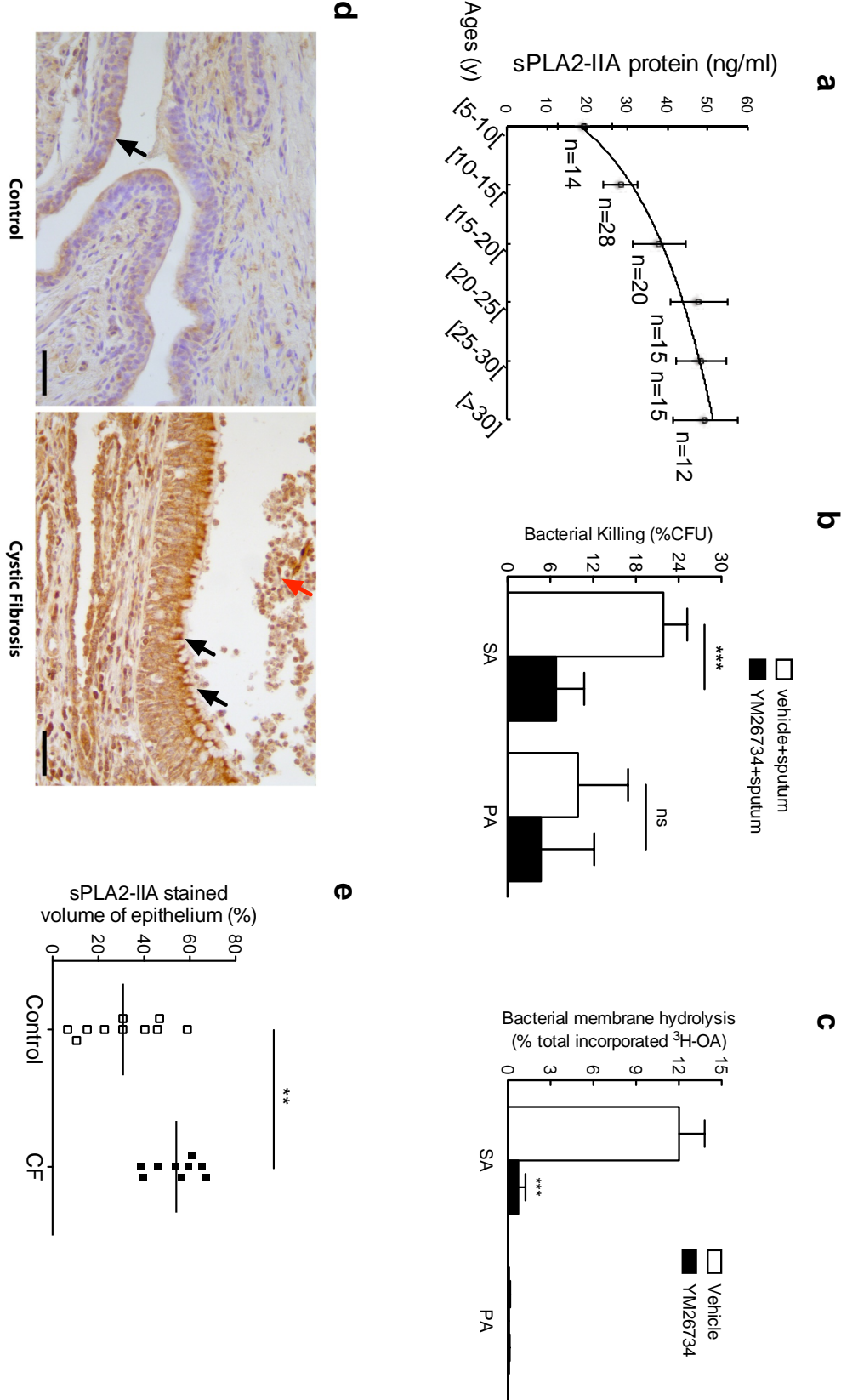


Fig. 2

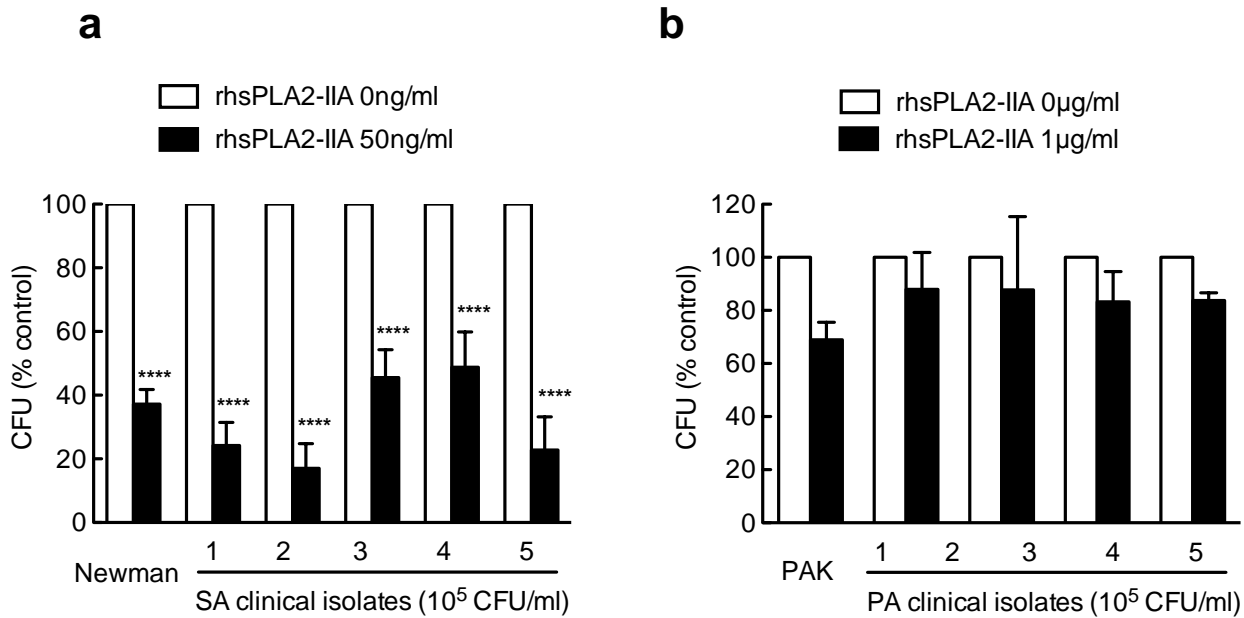


Fig. 3

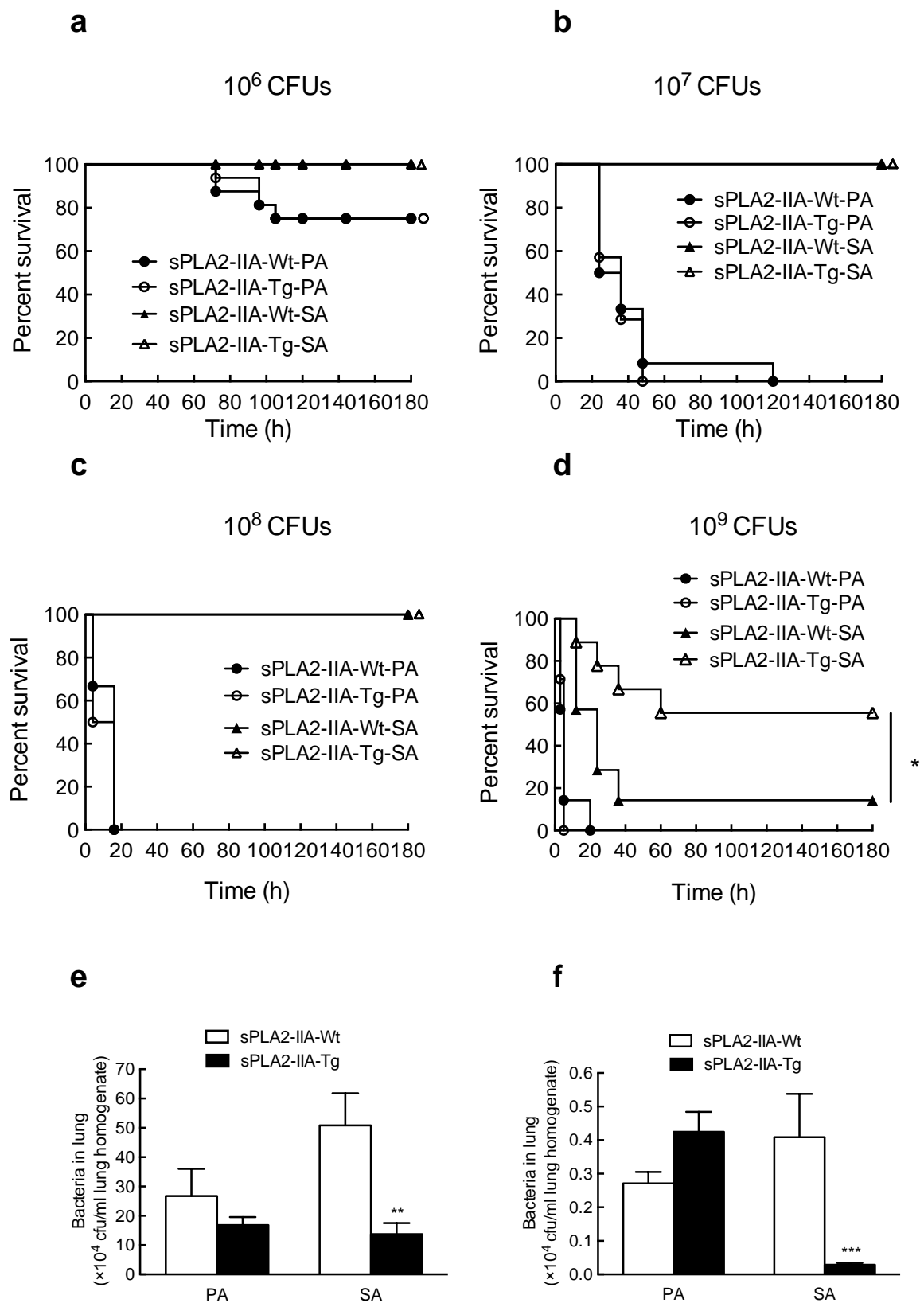


Fig. 4

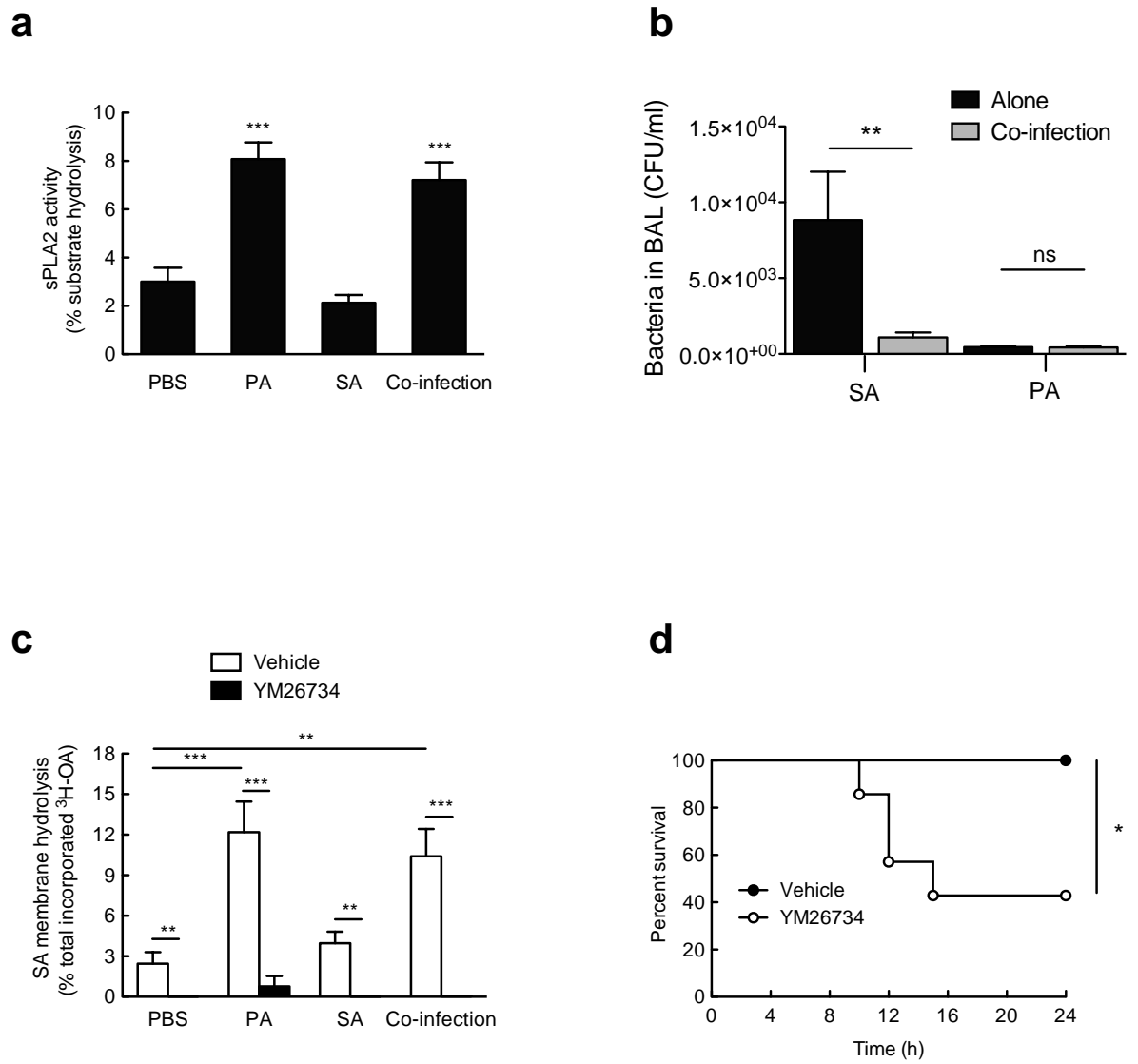


Fig. 5

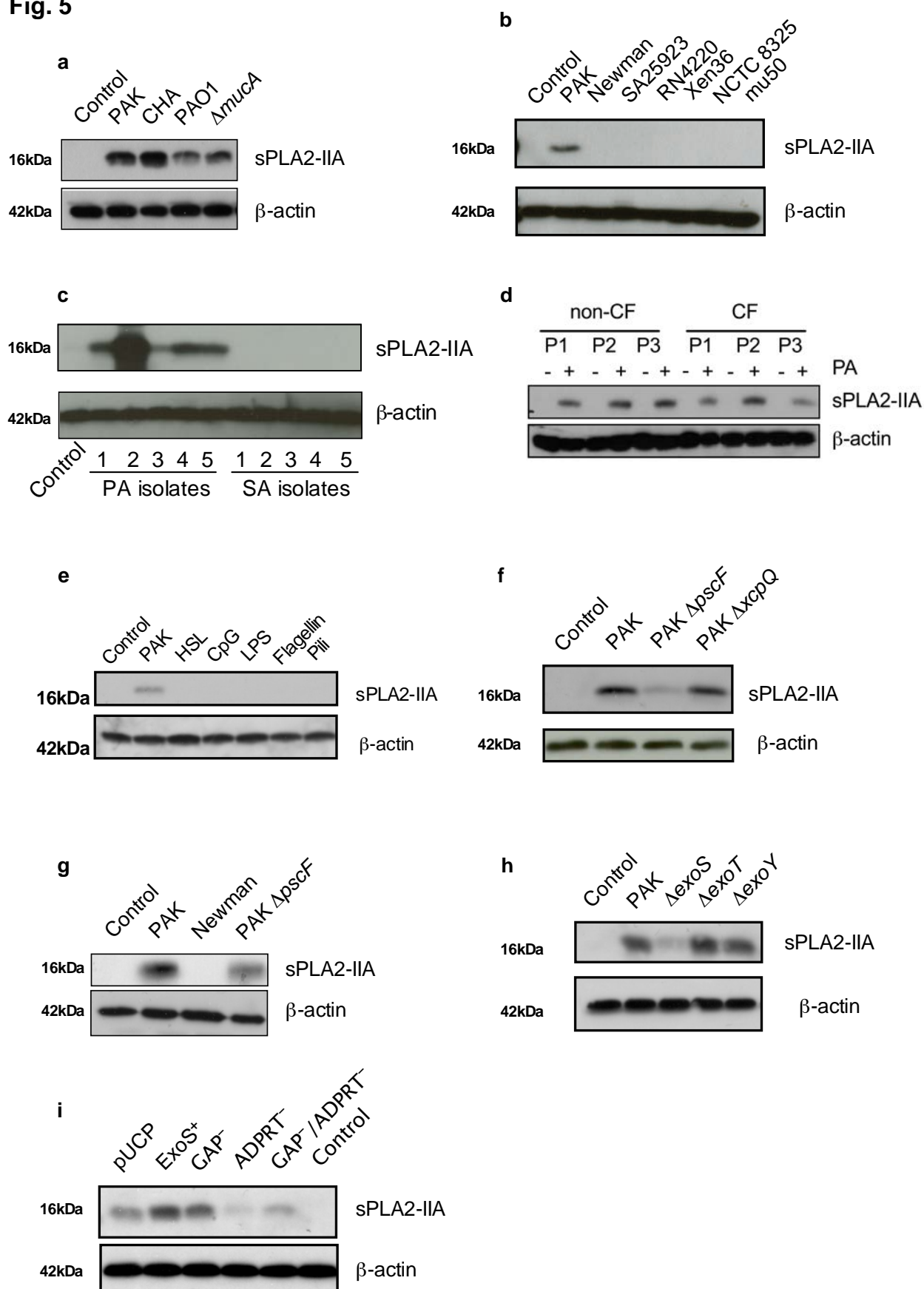
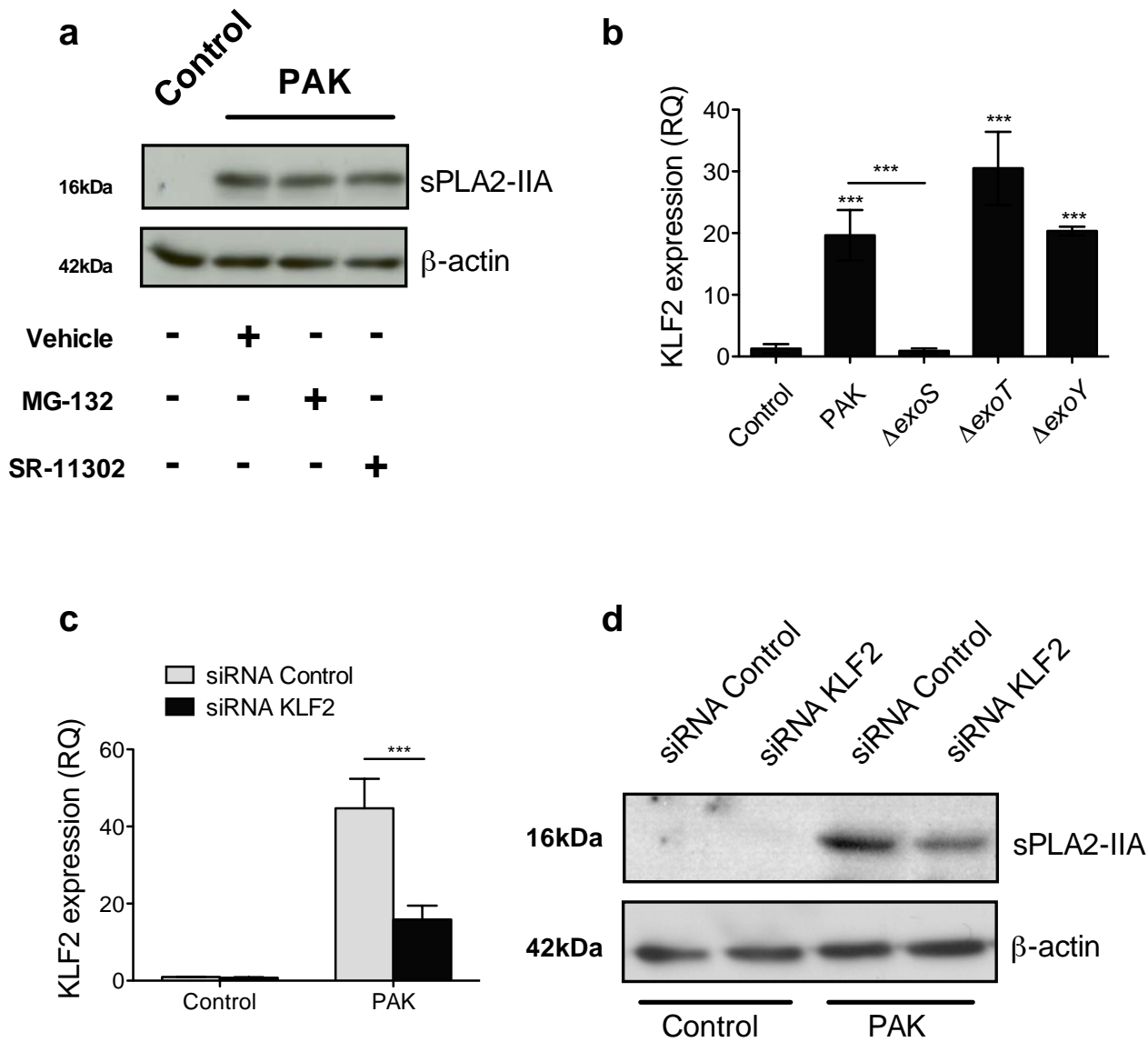


Fig. 6



SUPPLEMENTARY DATA

Pseudomonas aeruginosa eradicates ***Staphylococcus aureus*** by manipulating the host immunity.

Erwan PERNET^{1,2,3}, Laurent GUILLEMOT^{1,2}, Pierre-Régis BURGEL⁴, Clémence MARTIN⁴, Gérard LAMBEAU⁵, Isabelle SERMET-GAUDELUS⁶, Dorota SANDS⁷, Dominique LEDUC^{1,2}, Philippe MORAND⁸, Louise JEAMMET⁵, Michel CHIGNARD^{1,2}, Yongzheng WU^{1,2*\$} Lhousseine TOUQUI^{1,2*\$}

1. Unité de défense innée et inflammation, Institut Pasteur, Paris, France

2. INSERM U874, Paris, France

3. Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

4. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; Service de Pneumologie, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France

5. Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, UMR 7275 Centre National de la Recherche Scientifique et Université de Nice Sophia Antipolis, Sophia Antipolis, Valbonne, France

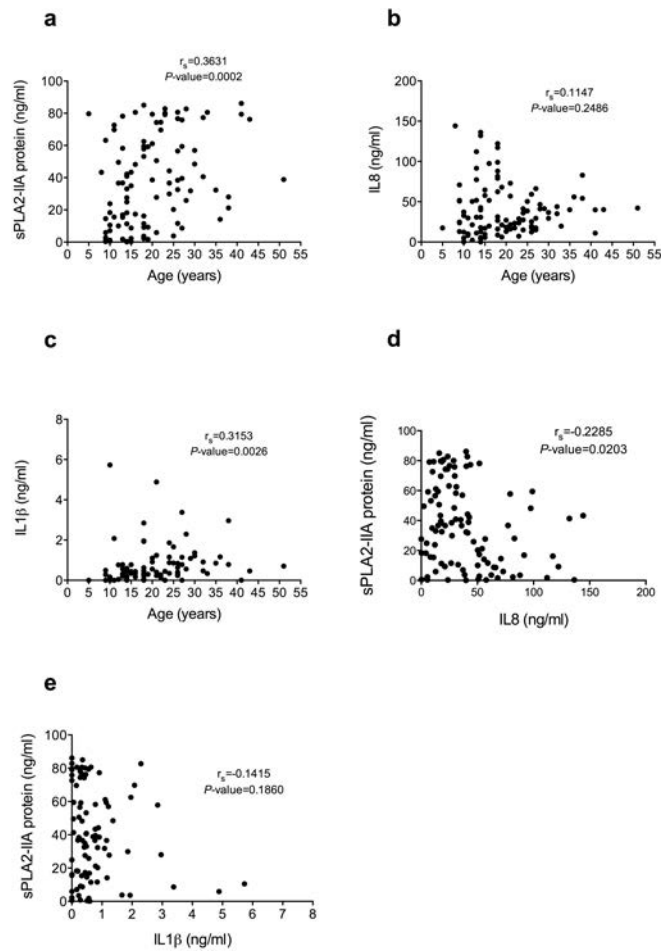
6. INSERM U 806, Université René Descartes, CRCM, Service de Pneumo-Pédiatrie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France.

7. Institute of Mother and Child, CF Centre, Warsaw, Poland

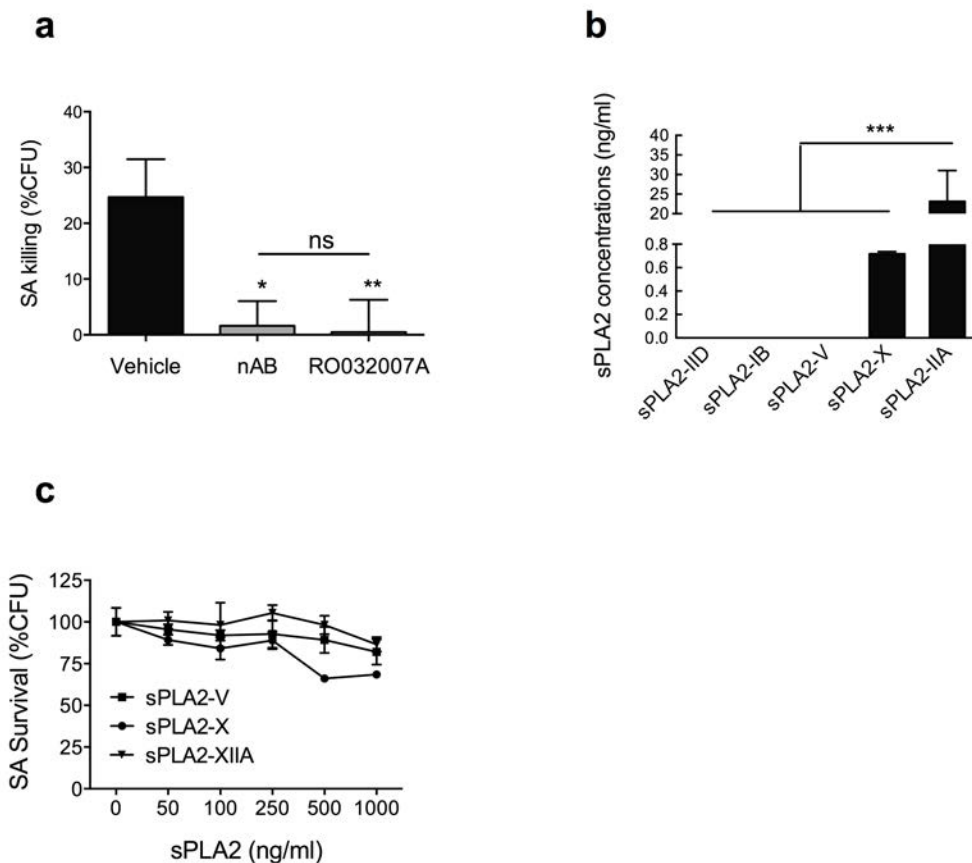
8. Service de Bactériologie, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

* Corresponding authors: Unité de défense innée et inflammation / INSERM U874, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Tel: +33(0)145688684/+33(0)145688683; Fax: +33 (0)145688703; Email: lhousseine.touqui@pasteur.fr; yongzheng.wu@pasteur.fr

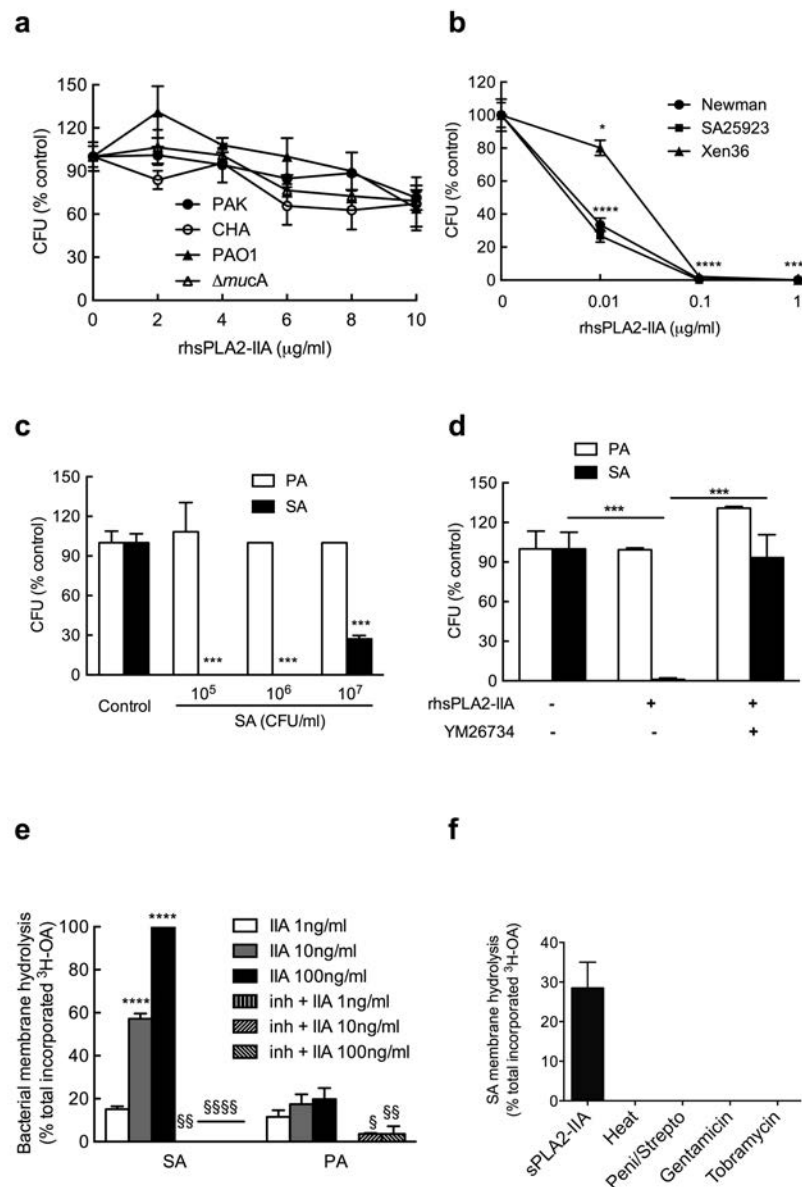
\$ These authors jointly supervised the work.



Supplementary Figure 1. IL8 and IL1 β do not account for sPLA2-IIA production in CF expectorations. (a) sPLA2-IIA levels as a function of age without clustering. Increased sPLA2-IIA levels were significantly correlated with the increase of age of CF patients ($r_s = 0.3631$, $P\text{-value} = 0.0002$, Spearman correlation test). (b) IL8 concentration in expectorations was not correlated with age of patients. (c) Positive correlation between IL1 β levels and age of CF patients ($r_s = 0.3153$, $P\text{-value} = 0.0026$, Spearman correlation test). (d) Negative correlation was found between IL8 and sPLA2-IIA concentrations in CF patients expectorations ($r_s = -0.2285$, $P\text{-value} = 0.0203$, Spearman correlation test). (e) No significant correlation was observed between IL1 β and sPLA2-IIA levels in expectorations ($r_s = -0.1415$, $P\text{-value} = 0.1860$, Spearman correlation test). $n \geq 92$. sPLA2-IIA levels were assayed using EIA kit. IL8 and IL1 β concentrations were assayed by ELISA.

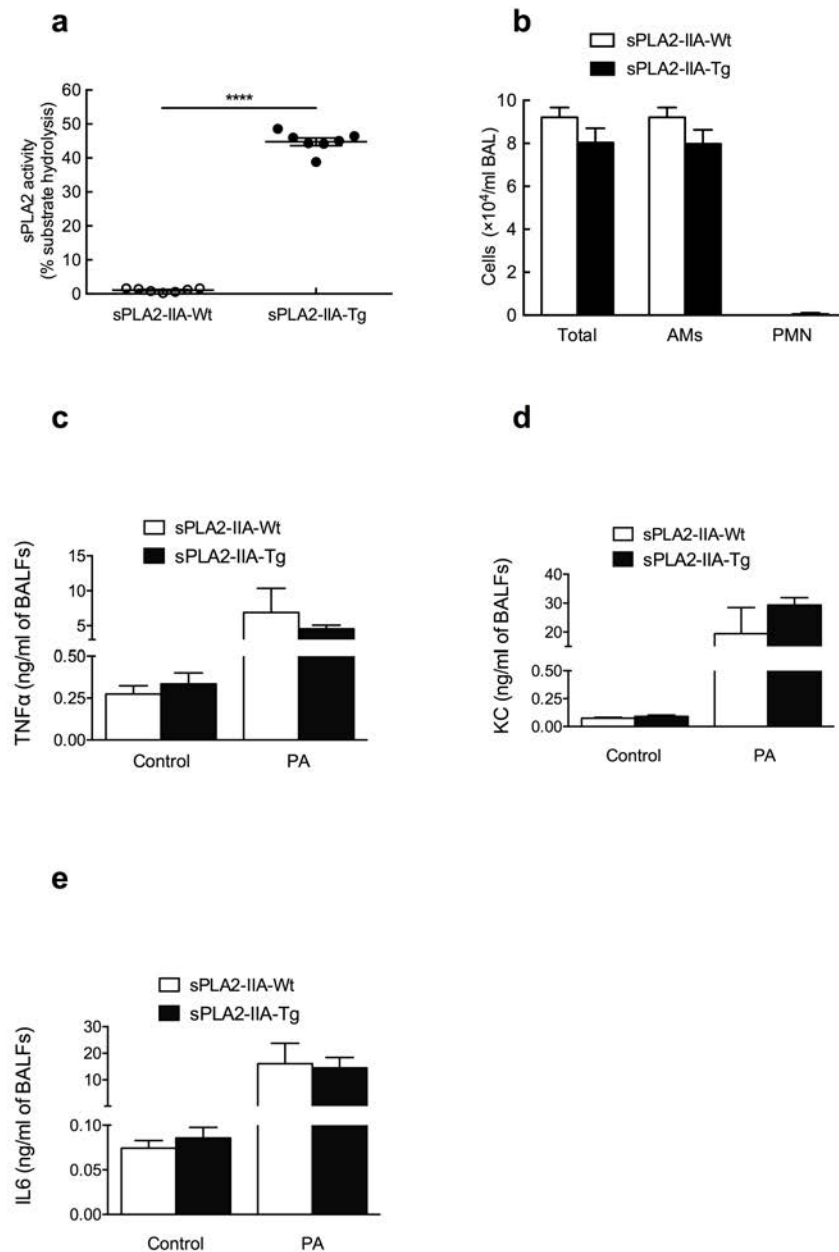


Supplementary Figure 2. Bactericidal effect of sputum is dependent on sPLA2-IIA. (a) SA was incubated for 2 hours with sputum incubated with vehicle alone (DMSO), a specific sPLA2-IIA neutralizing antibody (nAB, 10 μ g/ml) or a more specific sPLA2-IIA inhibitor (RO032007A, 10 μ M; kindly provided by Pr. Michael Gelb, Seattle, USA). SA killing was assayed by CFU counting on LB agar plates. n=7 (b) sPLA2s (group IID, IB, V, X and IIA) levels in sputum were measured by specific time-resolved fluorescence immunoassays (TRFIA). Only sPLA2-IIA and sPLA2-X were detected. n=104 (c) Group V, X and XIIA sPLA2s had limited effect on SA killing. SA was incubated with different sPLA2s from 50 ng/ml to 1000ng/ml for 2 hours and survival was assayed by CFU counting. n=3. (a-c) The data were presented as mean \pm s.e.m. Levels of statistical significance were determined using one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple's comparisons test * P -value<0.05, ** P -value <0.01, *** P -value <0.001, ns: non significant.

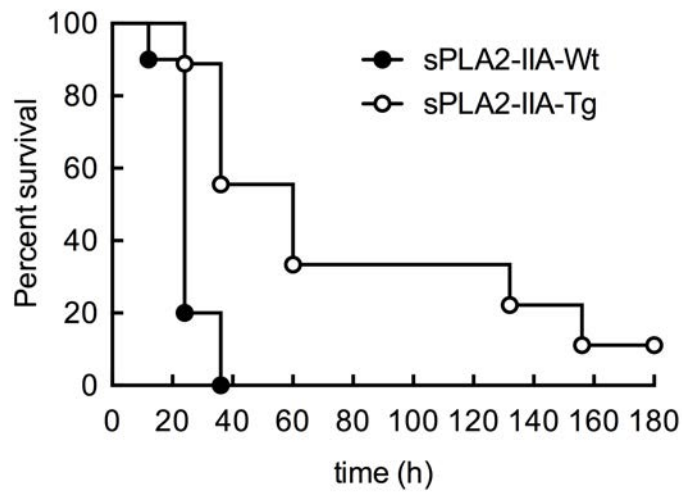


Supplementary Figure 3. Laboratory strains of SA are sensitive to killing by rhsPLA2-IIA. (a, b) Percentage of bacterial colonies of PA (a) or SA (b) killed by rhsPLA2-IIA *in vitro*. Bacteria (10^5 CFU/ml) were incubated with increasing concentrations of rhsPLA2-IIA for 2 hours. Survival was quantified by counting CFUs on LB agar plates. (c) Percentage of CFU after incubation of rhsPLA2-IIA (100ng/ml) with mixed suspension of PA (10^5 CFU/ml) and SA (10^5 - 10^7 CFU/ml). (d) Percentage of PA or SA (10^5 CFU/ml) killed by rhsPLA2-IIA (100ng/ml) in the presence or absence of the sPLA2 inhibitor, YM26734 (10 μM). The latter was incubated with rhsPLA2-IIA 30 min before adding bacteria. (e) Membrane phospholipids hydrolysis of $^3\text{H-OA}$ labeled SA and PA by rhsPLA2-IIA (IIA) and effect of YM26734 (10 μM) on

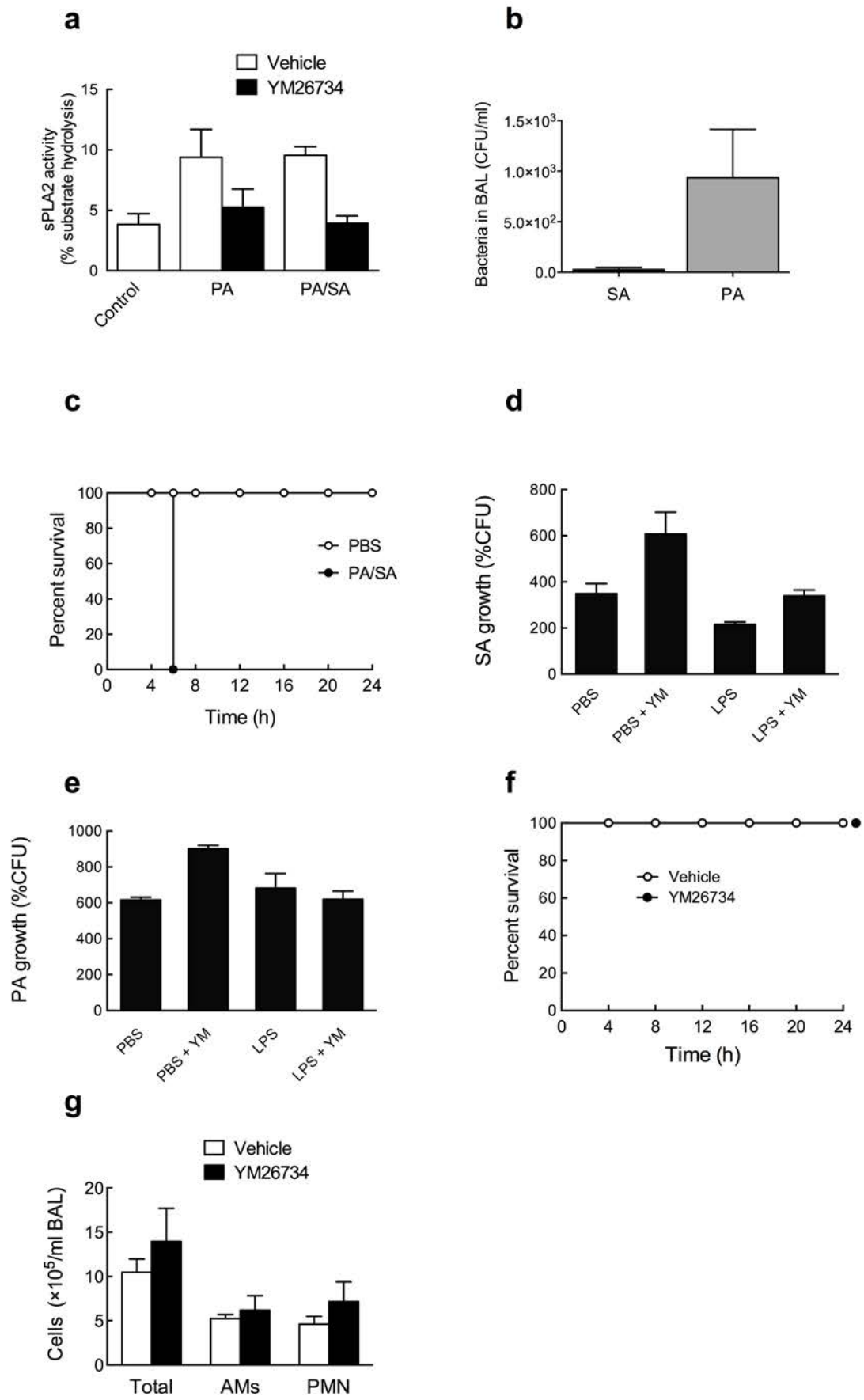
this hydrolysis. The results showed the percentage of phospholipids hydrolysis. (f) Membrane phospholipids hydrolysis of ^3H -OA labeled SA treated with rhsPLA2-IIA (sPLA2-IIA), penicillin/streptomycin solution (peni/strepto, 100U each), gentamicin (300 $\mu\text{g/ml}$) and tobramycin (50 $\mu\text{g/ml}$), or heat-killed (100°C, 15 minutes). The results showed the percentage of phospholipids hydrolysis. (a-f) The data were presented as mean \pm s.e.m. from at least three independent experiments. Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple's comparisons test. * P -value <0.05 , *** P -value <0.001 , **** P -value <0.0001 compared to the corresponding control (b, c), 1ng/ml of sPLA2-IIA-treated group (e) or as indicated (d). § P -value <0.05 , §§ P -value <0.01 , §§§§ P -value <0.0001 , compared to corresponding treatment in the absence of inhibitor.



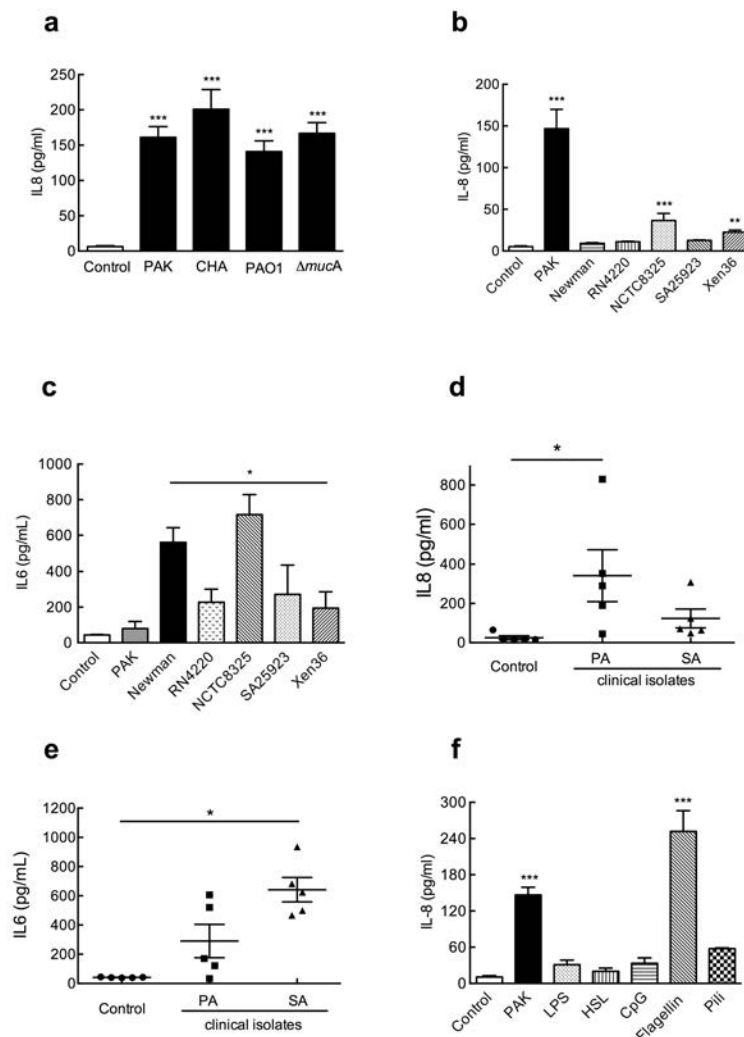
Supplementary Figure 4. Over-expression of human sPLA2-IIA in transgenic mice does not induce inflammation. (a) sPLA2 activity assay in BALF of sPLA2-IIA-Tg and sPLA2-IIA-Wt mice. (b) Cell counts in BAL from non-treated sPLA2-IIA-Tg and sPLA2-IIA-Wt mice. (c-e) Concentrations of TNF α (c), KC (d) and IL6 (e) in BALFs from non-treated or PA-infected sPLA2-IIA-Tg and sPLA2-IIA-Wt mice. Seven mice were pooled for each group. The data were presented as mean \pm s.e.m. **** P -value <0.0001 determined by Mann-Whitney test.



Supplementary Figure 5. Mortality of sPLA2-IIA mice after intra-tracheal instillation of SA25923 strain of SA (10^9 CFU/mouse in 50 μ l of PBS). Data were presented as Kaplan-Meier curves and one representative of 3 independent experiments is shown ($n \geq 7$ per group, P -value=0.0013 determined by Log-rank test).

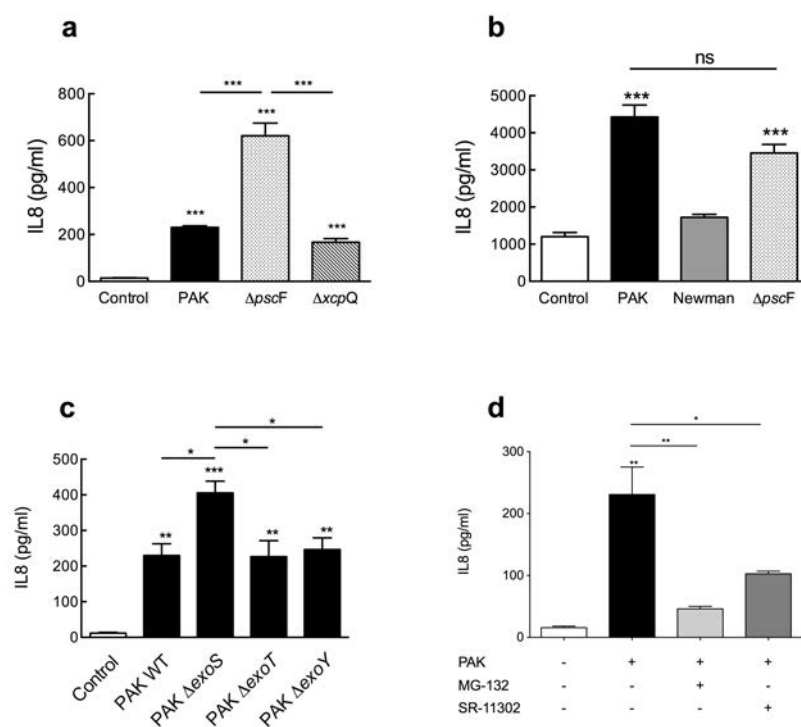


Supplementary Figure 6. YM26734 inhibits sPLA2 activity in BALFs without effect on inflammation in guinea pigs. (a) sPLA2 activity in BALFs from PA and PA/SA infected guinea pigs treated with vehicle or YM26734 (10 μ M). (b) Guinea pigs were infected with 5x10⁶ CFUs of SA or PA. Twenty-four hours later, bacterial loads were enumerated in BALs on LB agar plate. (c) Survival of guinea pigs infected with 5x10⁷ CFUs of PA in combination with SA. (d, e) Guinea pigs lungs were harvested 24 hours after intra-tracheal instillation of PBS or LPS (300 μ g/kg of body weight), homogenized and aliquots of 90 μ l were incubated with 10⁵ CFU/ml of SA (d) and PA (e) for 2 hours in killing buffer. CFU viability was assayed by plating on LB agar plates. Bar graphs showed growth of bacteria in lung homogenates as % of original inoculum. When indicated, the sPLA2 inhibitor YM26734 (10 μ M) was added to lung homogenates 30 minutes before incubation. (f, g) Survival (f) and cell count in BALs (g) of guinea pigs pretreated with YM26734. Two doses of YM26734 (2 mg/kg body weight) or vehicle were intravenously injected 24 and 1 h before given the 3rd dose through intra-tracheal instillation. Twenty-four hours after the 3rd dose, cell counts were examined. The data are presented as mean \pm s.e.m. n \geq 3 guinea pigs per group.

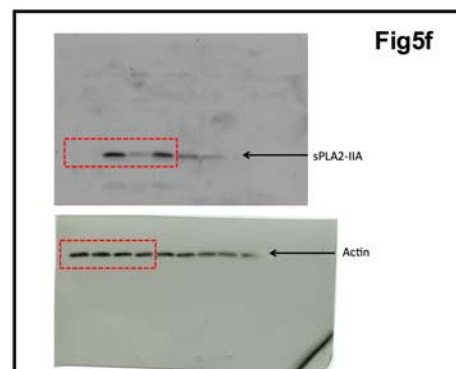
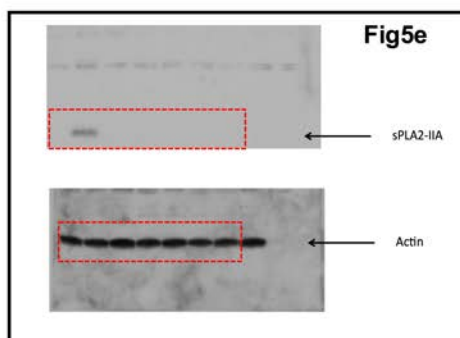
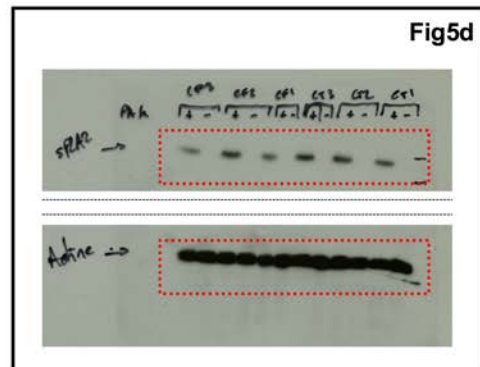
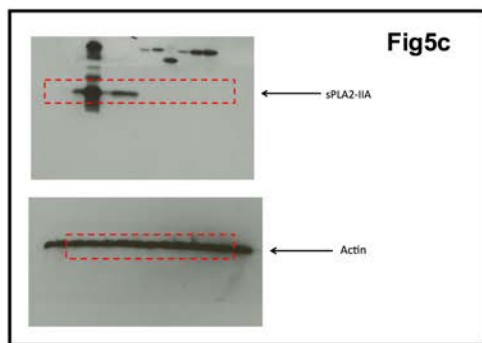
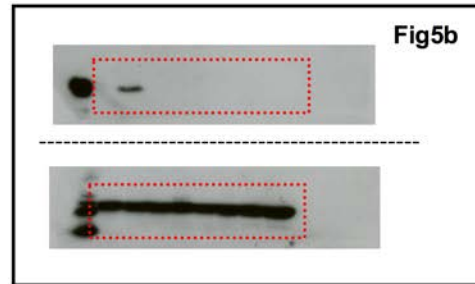
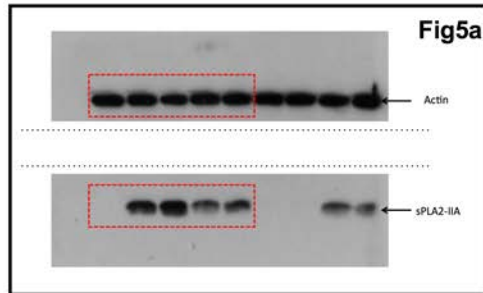


Supplementary Figure 7. Secretion of IL8 and IL6 by IB3-1 cells after infection with laboratory strains and clinical isolates of SA and PA. (a) IL8 secretion by IB3-1 cells infected with different laboratory strains of PA (MOI=5): PAO1, CHA, PAK and PAK $\Delta mucA$ (mucoid phenotype). (b-c) Adhered IB3-1 cells in culture dish were infected with laboratory strains of SA (MOI=5) including Newman, RN4220, NCTC8325, SA25923 and Xen36. IL8 and IL6 secretion in culture medium were examined by ELISA. PAK strain was used as control. (d-e) IL8 (d) and IL6 (e) secretion by IB3-1 cells infected with 5 clinical isolates of PA and SA (MOI=5) from different CF patients. (f) IB3-1 cells were incubated with different purified PAMPs preparation of PA, including LPS, flagellin, homoserine lactones (HSL), CpG and pili. IL8 secretion in culture medium was examined by ELISA. In these experiments, cells

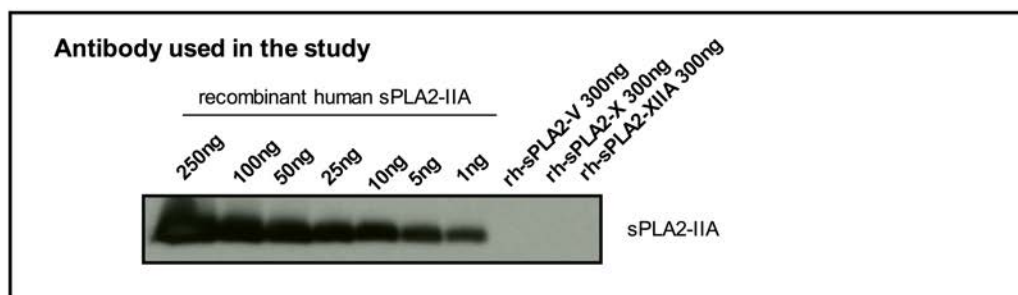
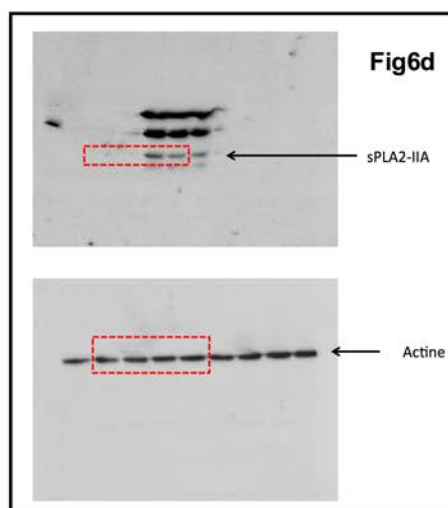
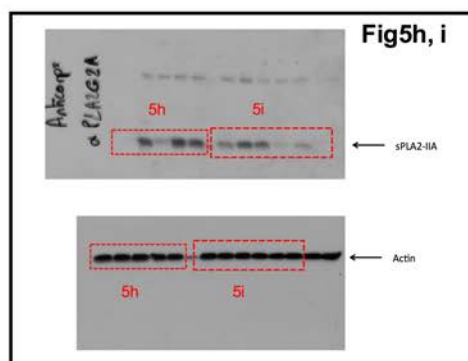
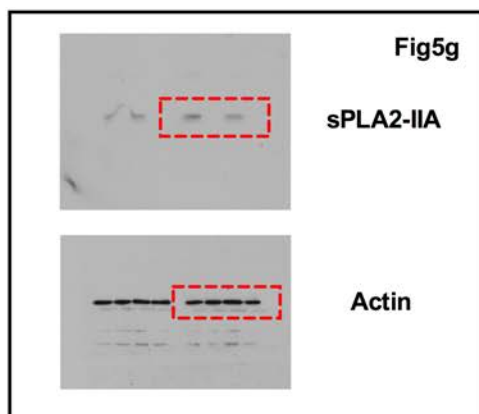
were incubated with bacteria for 1 h and rinsed 3 times to remove extracellular bacteria followed by additional 24 h incubation in the presence of antibiotics. PAMPs preparations were incubated for 24 h in the presence of antibiotics. The results were presented as mean \pm s.e.m from at least three independent experiments. **P*-value<0.05, ***P*-value<0.01, ****P*-value<0.001 determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple's comparisons test.



Supplementary Figure 8. IL8 secretion by IB3-1 and primary epithelial cells after infection with mutants of PAK strain. (a) IL8 secretion by IB3-1 cells after infection with mutant of PAK deficient for type 3 secretion system ($\Delta pscF$) or type 2 secretion system ($\Delta xcpQ$). Cells were infected with PAK wild type parental strain as positive control. (b) IL8 secretion in basal pole from primary human bronchial epithelial cells (phBECs) grown on transwell after infection by PA, SA and T3SS deficient strain at the apical pole. (c) IL8 secretion by IB3-1 cells after infection with mutant of PAK deficient for toxins ExoS ($\Delta exoS$), ExoT ($\Delta exoT$) and ExoY ($\Delta exoY$). Cells were infected with PAK wild type parental strain as positive control. (d) Effect of NF- κ B (MG-132, 3 μ M) and AP-1 (SR-11302, 1 μ M) inhibition on sPLA2-IIA expression in IB3-1 cells. Inhibitors were incubated with cells 30 min before infection. In these experiments, IB3-1 cells were infected with bacteria for 1 h and rinsed 3 times to remove extracellular bacteria, followed by additional 24 h incubation in the presence of antibiotics. pBECs were infected at the apical pole for 3 hours before being rinsed and incubated with antibiotics for 30 min. Then, cells were replaced in air-liquid interface. The results were presented as mean \pm s.e.m. from at least three independent experiments. * P -value<0.05, ** P -value<0.01, *** P -value<0.001, determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple's comparisons test.



Supplementary Figure 9. Original full scans of western blot.



Supplementary Figure 9. Original full scans of western blot.

Supplementary Table1. Clinical characteristics of Control and CF subjects.

	Controls (n=10)	CF (n=9)
Male gender , n	2	6
Age , years	63,4 (3)	35,1 (3,4)
FEV₁ , % predicted	101,9 (5,8)	20,4 (2)
CFTR genotype , n		
F508del / F508del	-	6
F508del /other	-	1
other/other	-	2
Bronchial colonization *, n		
<i>P. aeruginosa</i>	0	9
<i>S. aureus</i>	0	1
<i>S. maltophilia</i>	0	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	1

All data are mean (SD) or n. *Colonization with multiple pathogens is possible. FEV1: forced expiratory volume in 1 sec. FVC: forced vital capacity. CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

Article 2: *S. aureus* adenosine inhibits sPLA2-IIA-mediated host killing in the airways.

Erwan Pernet, Jérémy Brunet, Laurent Guillemot, Michel Chignard, Lhousseine Touqui et Yongzheng Wu.

Résumé :

L'adénosine sécrétée par *S. aureus* constitue un mécanisme d'échappement au système immunitaire. Nous avons étudié son rôle sur l'expression de la sPLA2-IIA dans le modèle du cobaye, où les macrophages alvéolaires (MA) représentent la source majoritaire de sPLA2-IIA endogène dans les voies respiratoires. Sur ces cellules, la souche sauvage de *S. aureus* n'avait pas d'effet sur l'expression de la sPLA2-IIA, au contraire de la souche ne produisant plus d'adénosine. Pour comprendre ce mécanisme nous avons recherché dans les MA i) comment *S. aureus* induisait l'expression de la sPLA2-IIA et ii) quelles étaient les voies d'inhibition de ce processus.

L'induction de l'expression de la sPLA2-IIA par *S. aureus* est dépendante de la phagocytose, suggérant l'implication d'un récepteur intracellulaire. En effet, nous avons mis en évidence le rôle de NOD2, senseur du motif MDP du peptidoglycane dans ce processus. La cascade de signalisation implique la kinase RIP2 ainsi que le facteur de transcription NF- κ B. Enfin, nous avons confirmé le rôle de la kinase p38 dans la phagocytose et l'expression de la sPLA2-IIA.

Nos résultats montrent que l'adénosine sécrétée par *S. aureus* active la voie cAMP/PKA. Deux récepteurs, A2a et A2b, sont responsables de l'augmentation des niveaux d'AMPc. L'utilisation d'inhibiteurs de ces deux récepteurs et de la kinase sous jacente PKA augmente l'expression de la sPLA2-IIA induite par la souche sauvage de *S. aureus*. Nous démontrons également que la voie impliquant les récepteurs à l'adénosine et la PKA module également la phagocytose. D'une manière intéressante l'adénosine n'altère pas la sécrétion d'IL8.

Par ce mécanisme, l'adénosine contribuerait à la pathogénie de *S. aureus* au niveau pulmonaire, favorisant son échappement à deux systèmes de défense, la phagocytose et l'hydrolyse des membranes par la sPLA2-IIA.

MAJOR ARTICLE

Staphylococcus aureus Adenosine Inhibits sPLA2-IIA-mediated Host Killing in The Airways

Erwan PERNET^{1,2,3}, Jérémy BRUNET^{1,2,4}, Laurent GUILLEMOT^{1,2}, Michel
CHIGNARD^{1,2}, Lhousseine TOUQUI^{1*\$}, Yongzheng WU^{1*\$}.

1. Unité Défense Innée et Inflammation, Institut Pasteur, Paris, France
2. Unité Défense Innée et Inflammation, Inserm U874, Paris, France
3. Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Dr Roux,
75015 Paris, France
4. Faculté des Sciences, Campus Universitaire d'Orsay, Université Paris-Sud, 15
rue Georges Clemenceau, 91405 Orsay Cedex, France

Corresponding authors: Unité de défense innée et inflammation / INSERM U874,
Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Tel: +33(0)145688683;
Fax: +33 (0)145688703; Email: touqui@pasteur.fr; yongzheng.wu@pasteur.fr

^{\$}These authors conjointly supervised the work.

Abstract words count: 149 words.

Main text words count: 3463 words.

FOOTNOTE PAGE

- (1) All authors do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest.
- (2) This work was supported by Vaincre la Mucoviscidose and Domaine d'intérêt Majeur-Maladies Infectieuses from the Région Ile de France.
- (3) This work has never been presented in meetings.
- (4) Correspondence: Lhousseine Touqui, Yongzheng Wu, Unité de Défense Innée et Inflammation / INSERM U874, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Tel: +33(0)145688683; Fax: +33 (0)145688703; Email: touqui@pasteur.fr; yongzheng.wu@pasteur.fr

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a common cause of bacterial infections such as respiratory diseases. It secretes molecules to dampen host immunity and the recently identified adenosine is one of these. The type IIA secretory phospholipase A2 (sPLA2-IIA) is a host protein endowed with antibacterial properties, especially against Gram-positive bacteria. However, the role of adenosine in sPLA2-IIA-mediated *S. aureus* killing is still unknown. Here we showed that the *S. aureus* mutant lacking adenosine production increases sPLA2-IIA expression in guinea pig airways and is cleared more efficiently than the wild type strain. *S. aureus* induces sPLA2-IIA expression by alveolar macrophages (AMs) after phagocytic process via NOD2-dependent mechanism. However, *S. aureus* adenosine down-regulates *S. aureus* phagocytosis leading to inhibition of sPLA2-IIA expression. This inhibition occurs via adenosine receptors A2a, A2b and PKA-dependent pathways. Our studies suggest that *S. aureus* escapes sPLA2-IIA-mediated killing from the airways through adenosine-mediated inhibition of phagocytosis and sPLA2-IIA expression.

Keywords: Innate immunity, phospholipase, adenosine, *S. aureus*, host-pathogen interaction

INTRODUCTION

Respiratory infections caused by *S. aureus* are a leading cause of community-acquired and healthcare-associated pneumonia [1-3]. In the airways, alveolar macrophages (AMs) are among the first cells that encounter bacteria and are required for the detection and clearance of bacteria. These cells sense the invading pathogen by recognizing specific pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through their pathogen recognition receptors (PRRs). TLR2, in association with TLR1 or TLR6, is the major PRR that recognizes both lipoteichoic acid (LTA) and peptidoglycan (PGN) of *S. aureus* [4, 5]. In addition to TLR2, intracellular receptor NOD2, that binds to muramyl dipeptide (MDP) motif of PGN, has also been shown to mediate innate immune response to *S. aureus* and antimicrobial peptide (AMPs) production [6-10]. The type IIA secretory phospholipase A2 (sPLA2-IIA) is one of the most effective AMP produced by the host [11]. sPLA2-IIA antibacterial activity is related to its ability to directly kill bacteria by hydrolyzing their membrane phospholipids [11]. As a consequence, this enzyme represents a major actor in innate host defense against bacterial infections [12]. Interestingly, Gram positive bacteria are highly sensitive to antibacterial activity of sPLA2-IIA [13-16]. Previous studies showed that sPLA2-IIA protected transgenic mice of bacterial infections [17-19]. However, the pathophysiological role of the endogenous sPLA2-IIA in the protection against *S. aureus* infection is still unknown.

Conversely, pathogens subvert host immunity *via* different strategies [20, 21]. Adenosine, produced from the degradation of ATP, ADP and AMP by the highly conserved cell-wall anchored adenosine synthase enzyme (AdsA) [22, 23] has been described recently as an important actor in *S. aureus* immune escape [24, 25]. In mammals, adenosine is sensed by four small G proteins-coupled membrane

receptors, among which, A2a and A2b receptors (A2aR and A2bR) increase cyclic AMP (cAMP) levels, while A1R and A3R decrease these levels [26]. Increased cAMP levels lead to protein kinase A (PKA) and the cAMP response element-binding protein (CREB) activation [27, 28]. The cAMP/PKA pathway has been shown to regulate sPLA2-IIA expression [29, 30], but the role of adenosine in the regulation of sPLA2-IIA expression is still unknown.

In this work, we investigated the role of the endogenous sPLA2-IIA in innate immunity against *S. aureus* infection and its modulation by adenosine using guinea pig model. We show that a *S. aureus* mutant lacking adenosine production increases sPLA2-IIA expression by AMs. We demonstrate that *S. aureus* PGN induces sPLA2-IIA expression by AMs *via* phagocytosis and NOD2-dependent mechanism. More importantly, we show that *S. aureus* adenosine down-regulates phagocytosis by AMs leading to inhibition of sPLA2-IIA expression through A2aR/A2bR and PKA-dependent pathways. Additionally, adenosine production decreased *S. aureus* clearance from airways. To conclude, our work highlight for the first time the contribution of NOD2 in sPLA2-IIA expression and a novel mechanism by which *S. aureus* subvert the host immunity by inhibiting the expression of this enzyme.

MATERIAL AND METHODS

Animals and reagents.

Male Hartley guinea pigs (5-7 weeks, ± 450 g or 2-3 weeks, ± 150 g) were purchased from Charles River, France. *Pseudomonas aeruginosa* LPS, Cytochalasin D and lysostaphin were from Sigma-Aldrich. BAY 11-7082 was purchased from Calbiochem. *S. aureus* lipoteichoic acid and peptidoglycan, Pam3CSK4, MDP, MDP control, CpG and gefitinib were from Invivogen. I κ B α antibody and MALP-2 were from Santa Cruz. ZM241385, PSB603, H-89, YM26734 were from Tocris. Phospho-CREB, phospho-p38, total-p38, phospho-ERK and total-ERK antibodies were from Cell Signaling Technologies.

Bacterial Strains

S. aureus strains RN4220, SA25823, NCTC8325, mu50 and Xen36 were obtained from Dr. Tarek Msadek (Institut Pasteur, Paris, France). *S. aureus* Newman wild type (WT) and $\Delta adsA$ mutant strains were obtained from Pr. Dominique Missiakas (University of Chicago, Chicago, IL, USA) and were used as described previously [24]. MOI were calculated using $0.5 \text{ OD} = 1 \times 10^8 \text{ CFUs/ml}$.

Infection of Guinea Pig Alveolar Macrophages

Guinea pigs (± 450 g) AMs were harvested by broncho-alveolar lavages (BALs) performed with PBS [30, 31]. AMs were seeded at 1×10^6 cells per ml. When indicated, inhibitors were added to AMs 1 hour before infection. AMs were infected with bacteria at MOI 25 for 1 hour, washed with PBS and incubated for additional 24 hours in serum-free RPMI supplemented with antibiotics (Penicillin/streptomycin

100U/ml each and gentamicin 300µg/ml). AMs were stimulated with purified PAMPs for 24 hours.

For adhesion assays, AMs were incubated for 30 minutes with bacteria, lysed in PBS-Triton 0.1% and total CFUs were enumerated on agar plates. For phagocytosis assays, AMs were incubated with bacteria for 1 hour, washed with PBS and extracellular bacteria were killed by lysostaphin (10µg/ml) for 10 minutes. AMs were washed and lysed with PBS-Triton 0.1%. Intracellular bacteria were counted on agar plates. Relative phagocytosis (number of intracellular CFUs/CFUs from inoculum) was calculated using the WT strain phagocytosis as internal reference.

RNA Extraction and Quantitative PCR

Total RNA was extracted from AMs using RNeasy minikit (Qiagen). sPLA2-IIA expression was analysed by RT-qPCR using Abi-Prism 7900HT and Sybr green master mix (Roche). Primers sequences were Actin (F : CTGTGCTGTCCCTGTATGC, R :CCGTGGTGGTGAAACTGTAG) and sPLA2-IIA (F :ACAAGTTATGGCGCCTATGG, R : GCCCAGTGTAGCTGTGAAGC). Results are presented as relative quantification (RQ) of gene expression using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Protein extraction, immunoblotting and IL-8 measurement.

These techniques were performed as described previously [30, 34].

Transient Plasmid Transfection

Chinese Hamster Ovary cells (CHO) were cultured in F-12K medium with 10% (v/v) FBS and antibiotics (Penicillin/streptomycin 100U/ml each). Transfection with plasmid bearing sPLA2-IIA wild type promoter (sPLA2-IIA WT) and promoter lacking the

binding site of NF- κ B (Δ NF- κ B) [35] was performed in FBS-containing medium, using 0.6 μ L of FuGENE[®] 6 (Promega), 100 ng of plasmid DNA, 30 ng of plasmid Renilla for 24 hours. Transfected cells were stimulated with MDP (10 μ g/mL), MDPc (10 μ g/mL) in serum-free F-12K for 24 hours before luciferase was measured using Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System kit (Promega) and normalized to Renilla.

***In vivo* Infection**

Animals were housed in the Institut Pasteur animal facilities. Work on animals was performed in compliance with French and European regulations on care and protection of laboratory animals and was approved by the Ethics Committee #89 and registered under the reference 2014-0014. Guinea pigs (\pm 150 g) were infected by 5×10^7 CFUs of the *S. aureus* WT or Δ *adsA* strains. Bacterial suspension (150 μ L of in PBS) was instilled intranasally through one nostril. Twenty-four hours after infection, BALs were performed with 5 ml of PBS (injected/aspirated 3 times). Bacterial loads were evaluated by CFUs counting on agar plates. Cells in BALs were counted and analysed by cytospin. IL-8 was assayed in BAL fluids (BALFs) by ELISA. sPLA2-IIA expression in 10^7 isolated cells from BALs was quantified by RT-qPCR. In certain experiments, sPLA2 inhibitor YM26734 (2 mg/kg body weight) or vehicle (DMSO) was instilled to animals directly with bacteria.

Statistical Analyses

Results are presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. The levels of statistical significance were determined by Student's *t* test, one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

RESULTS

***S. aureus* Adenosine Inhibits sPLA2-IIA Expression in AMs**

Our previous studies have shown that AMs are the major source of sPLA2-IIA in guinea pigs airways and contribute to inflammation by secreting IL-8, a key inflammatory chemokine, in response to various pathogens [30, 31]. Here, we examined the effect of *S. aureus* adenosine on sPLA2-IIA expression by AMs, in parallel to IL-8 secretion as a control of inflammation. We found that various strains of *S. aureus* failed to induce sPLA2-IIA expression as compared to LPS from *P. aeruginosa*, used as a positive control. However, all these strains stimulated IL-8 secretion (Figure 1A, Supplementary Figure 1A). We next examined the role of adenosine in sPLA2-IIA expression using the $\Delta adsA$ mutant strain, deficient in adenosine production [Thammavongsa:2009cu]. Infection with this mutant significantly increased sPLA2-IIA expression by AMs compared to non-infected cells or to the WT strain-infected cells (Figure 1B). However, no difference was observed in IL-8 secretion by AMs infected with the two bacterial strains (Supplementary Figure 1B). This suggests that *S. aureus* adenosine inhibits sPLA2-IIA expression by AMs, but had no effect on IL-8 expression.

***S. aureus* Induces sPLA2-IIA Expression via NOD2 Receptor**

Based on the above results, we investigated how does the $\Delta adsA$ strain of *S. aureus* induce sPLA2-IIA expression. We first searched for the *S. aureus* PAMP(s) and associated receptor involved in sPLA2-IIA expression by AMs using purified PGN (ligand of TLR2 and NOD2) and LTA (ligand of TLR2). Our results showed that PGN significantly increased sPLA2-IIA expression by AMs, whereas LTA had a limited effect on this expression, suggesting a role for NOD2 (Figure 2A). However, both

PGN and LTA induced IL-8 secretion (Supplementary Figure 1C). To examine the role of NOD2 in PGN-induced sPLA2-IIA expression, AMs were incubated with MDP (ligand of NOD2), MDPc (inactivated MDP), MALP-2 (ligand of TLR2/6), Pam3CSK4 (ligand of TLR2/1) and CpG (agonist of TLR9). Remarkably, only MDP strongly induced sPLA2-IIA expression by AMs (Figure 2B). However, both TLR2 and NOD2 ligands induced IL-8 secretion (Supplementary Figure 1D). These results suggested that NOD2 might be the unique receptor mediating PGN-induced sPLA2-IIA expression in AMs. We then hypothesized that the $\Delta adsA$ mutant strain was more internalized by AMs than the WT strain, leading to more effective interaction with NOD2. This led us to examine the impact of adenosine on *S. aureus* phagocytosis in our cell model. We showed that both strains exhibited similar adhesion to AMs (Supplementary Figure 1E), but that the $\Delta adsA$ strain was two times more phagocytized by AMs compared to the WT strain (Figure 2C). In addition, incubation of AMs with cytochalasin D significantly decreased sPLA2-IIA expression induced by both the WT and the $\Delta adsA$ strain (Figure 2D) without significant effect on IL-8 secretion (Supplementary Figure 1F). Taken together, these results indicated that phagocytized *S. aureus* induces sPLA2-IIA expression through PGN-NOD2 interaction. Conversely, *S. aureus* produces adenosine that inhibits its phagocytosis leading to decreased sPLA2-IIA expression.

***S. aureus*-induced sPLA2-IIA Expression Is Dependent on RIP2 Kinase and NF- κ B Transcription Factor**

We next investigated the downstream signals by which NOD2 mediated *S. aureus*-induced sPLA2-IIA expression in AMs, starting with the NOD2-activated RIP2 kinase [32]. Incubation of AMs with the RIP2 pharmacological inhibitor Gefitinib abolished

the effect of the *S. aureus* $\Delta adsA$ mutant on sPLA2-IIA expression (Figure 3A), but had no effect on IL-8 secretion (Supplementary Figure 2A). Furthermore, we investigated the role of NF- κ B, located downstream RIP2 and major regulator of sPLA2-IIA expression [33, 34]. In agreement, our results showed that BAY 11-7082 (an inhibitor of I κ B α phosphorylation) significantly reduced *S. aureus*-induced sPLA2-IIA expression (Figure 3B) as well as IL-8 secretion (Supplementary Figure 2B). In addition, I κ B α degradation, that reflects NF- κ B activation, was increased in AMs infected by the $\Delta adsA$ mutant compared to those infected by the WT strain (Figure 3C). We further confirmed the role of NF- κ B using the CHO cell line transfected with a luciferase plasmid bearing the sPLA2-IIA WT promoter or the mutant promoter in which the NF- κ B binding site was deleted (Δ NF- κ B) [35]. MDP, but not MDPc, significantly increased sPLA2-IIA promoter activity (Figure 3D). However, deletion of the NF- κ B binding abolished this induction (Figure 3D). Together, these data indicated that *S. aureus* induced sPLA2-IIA expression through a NOD2-RIP2 and NF- κ B-dependent pathway.

Adenosine Impairs sPLA2-IIA Expression by Inhibiting *S. aureus* Phagocytosis via A2a/A2b Receptors and PKA Pathway

We next investigated the role of adenosine in the modulation of sPLA2-IIA expression by AMs. Adenosine regulates intracellular cAMP levels leading to PKA activation and CREB transcription activity [26]. Our results showed that the *S. aureus* WT strain induced a stronger phosphorylation of CREB than the $\Delta adsA$ mutant (Figure 4A). Among adenosine receptors, only A2aR and A2bR increase cAMP levels [26], leading us to study their role in sPLA2-IIA inhibition. We found that the pharmacological inhibitors of both the A2aR (ZM241385) and A2bR (PSB603),

decreased CREB phosphorylation induced by *S. aureus* WT strain (Supplementary Figure 2C). Interestingly, these inhibitors increased sPLA2-IIA expression induced by the *S. aureus* WT strain (Figure 4B). However, these inhibitors had no effect on IL-8 secretion, supporting our hypothesis that different signaling pathways modulate sPLA2-IIA and IL-8 expression (Supplementary Figure 2D).

These results led us to investigate the role of PKA in the modulation of sPLA2-IIA expression. Our results showed that the PKA pharmacological inhibitor H-89 decreased CREB phosphorylation induced by the *S. aureus* WT strain (Supplementary Figure 2E). We also found that inhibition of PKA increased sPLA2-IIA expression by AMs infected by the *S. aureus* WT strain (Figure 4C). Here again, this inhibitor had no effect on IL-8 production by AMs (Supplementary Figure 2F). We also examined the role of A2aR/A2bR and PKA on *S. aureus* phagocytosis by AMs. Inhibition of either A2aR and A2bR or PKA strongly increased phagocytosis of *S. aureus* WT strain (Figure 4D, E). These results suggested that the A2aR/A2bR-PKA pathway modulates sPLA2-IIA expression *via* inhibition of *S. aureus* phagocytosis.

Adenosine Inhibits Phagocytosis of *S. aureus* Through p38 Inactivation

Next, we attempted to investigate the mechanism by which adenosine inhibited *S. aureus* phagocytosis. It has been reported that MAPK modulate *S. aureus* phagocytosis [36]. Here, we showed that the *S. aureus* $\Delta adsA$ mutant increased p38 phosphorylation, but had no effect on ERK phosphorylation, compared to the WT strain (Figure 5A). Incubation of AMs with the p38 inhibitor, SB203580, decreased phagocytosis of both the *S. aureus* WT and $\Delta adsA$ strains to similar levels (Figure 5B). These results suggested that increased p38 activation was responsible for the enhanced phagocytosis of the $\Delta adsA$ strain. As expected, p38 inhibition also

abolished *S. aureus*-induced sPLA2-IIA expression (Figure 5C) and decreased IL-8 secretion by AMs (Supplementary Figure 3A). Moreover, our results showed that inhibition of A2aR/A2bR and PKA increased the p38 phosphorylation (Figure 5D). Taken together, these data suggested that the A2a/A2b-PKA pathway inhibits *S. aureus* phagocytosis by AMs through modulation of p38 phosphorylation.

Adenosine Protects *S. aureus* from sPLA2-IIA-mediated Killing in Guinea Pigs Airways

All above findings prompted us to examine the pathophysiological relevance of adenosine-mediated sPLA2-IIA inhibition in guinea pigs airways. Animals were infected by intranasal instillation of the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strain. Compared to PBS instillation, *S. aureus* infection increased (though not significant) the total cell counts and neutrophils recruitment in the airways (Figure 6A). No significant difference in cell recruitment was observed between the *S. aureus* WT and $\Delta adsA$ strains (Figure 6A), with only marginal effect on IL-8 secretion (Supplementary Figure 3B). In addition, cells isolated from BALs of $\Delta adsA$ -infected animals had higher levels of sPLA2-IIA expression compared to those from WT strain-infected animals (Figure 6B). Interestingly, it was correlated to a higher clearance of the $\Delta adsA$ strain of *S. aureus* from guinea pigs airways compared to that of the WT strain (Figure 6C). Remarkably, instillation of the sPLA2 pharmacological inhibitor, YM26734, reversed the clearance of the $\Delta adsA$ strain but had no effect on that of the WT strain (Figure 6D).

Taken together these findings suggested that inhibition of sPLA2-IIA expression by adenosine improved *S. aureus* survival in the airways.

DISCUSSION

S. aureus is a major opportunistic human pathogen known to cause a wide range of infections such as pulmonary disease [1, 2]. Using a guinea pig model of pulmonary infection, we demonstrated for the first time the role of the endogenous sPLA2-IIA in the host response against *S. aureus* infection. Our results showed that during infection of airways, *S. aureus* initiates its own phagocytosis by AMs. The phagocytized *S. aureus* is sensed by the NOD2 intracellular receptor, via the PGN motifs of this bacterium. Engagement of NOD2 leads to sPLA2-IIA induction and subsequent bacterial killing by this enzyme. However, the present studies also showed that *S. aureus* is able to evade host defense through a process involving adenosine production by this bacterium. We showed that adenosine inhibits *S. aureus* phagocytosis using the host A2aR/A2bR-PKA pathway, resulting in the inhibition of sPLA2-IIA expression. Interestingly, this inhibition was specific to sPLA2-IIA, as IL-8 expression was not affected by adenosine both *in vivo* and *in vitro*. All these findings might have important implications for understandings of the mechanisms of *S. aureus* pathogenesis in the airways.

The sPLA2-IIA enzyme is one of the most efficient antimicrobial peptides of the host against bacterial infections, in particular by Gram positive bacteria [11, 14]. It hydrolyzes membrane phospholipids, major structural components of bacterial cell wall, leading to bacteria death. In transgenic mouse model, sPLA2-IIA has been shown to protect animals from intraperitoneal or pulmonary infections by *S. aureus* or *B. anthracis* respectively [17, 19]. However, these transgenic mice are artificial models with constitutive overexpression of sPLA2-IIA [37]. On the other hand, mice are known to exhibit no or very low sPLA2-IIA expression in the lung due to the natural deficiency of sPLA2-IIA gene [38]. Therefore, we used guinea pigs as animal

model known to produce high pulmonary levels of sPLA2-IIA [31]. Our results showed that pulmonary infection with the *S. aureus* Δ *adsA* strain, deficient in adenosine production, increased sPLA2-IIA expression in guinea pigs lungs, leading to an enhanced clearance of *S. aureus* from the airways. Pre-treatment of animals with the pharmacological inhibitor of sPLA2, YM26734, abolished this clearance. Although YM26734 is not a specific inhibitor of sPLA2-IIA, this enzyme has been demonstrated as the major sPLA2 in guinea pigs airways and that AMs are the major source of this enzyme [31]. Different virulence factors from both Gram negative and Gram positive bacteria have been shown to induce sPLA2-IIA expression [30, 31, 39]. For instance, we showed that *B. anthracis* PGN induces sPLA2-IIA expression in AMs [30]. We found a similar effect of *S. aureus* PGN on this expression. We demonstrated here for the first time that NOD2-RIP2 signaling cascade, but not the surface receptors such as TLRs, mediated PGN-induced sPLA2-IIA expression. In addition, we also showed that phagocytosis of *S. aureus* by AMs is a key step in the induction of sPLA2-IIA expression by this bacterium. Engulfed bacteria are known to be degraded into phagolysosomes and to release PGN [40]. The latter is sensed by the cytoplasmic receptor NOD2 [6]. NOD2 is a powerful inducer of host immune response and is essential to control bacterial infections [7, 8, 41]. Consistent with our results on sPLA2-IIA expression, NOD2 has been shown to regulate expression of mouse AMPs, such as α and β -defensins [8, 10]. Thus, it supports the fact that NOD2 signaling pathway is a general inducer of AMPs production.

It is likely that pathogens establish different mechanisms to escape this phagocytic clearance. One of this mechanism involves the cAMP/PKA pathway, used by *B. pertussis* and *B. anthracis* to circumvent phagocytosis [42, 43]. Consistent with these results, we observed here that adenosine modulates *S. aureus* phagocytosis and

subsequent sPLA2-IIA expression through cAMP/PKA-dependent pathway. We also identified the role of the A2aR and A2bR, which increase cAMP levels and inhibit *S. aureus* phagocytosis and sPLA2-IIA expression. Adenosine is produced by many bacterial species *via* 5'-nucleotidases [24, 44]. Recently, Liu et al. reported that adenosine secreted by *S. suis* inhibits neutrophil degranulation and oxidative activity through the A2aR, favoring bacterial multiplication [44]. Thus, adenosine secretion may represent a general mechanism used by bacteria to escape both macrophages and neutrophils-mediated innate immune response.

In addition to its effects on phagocytosis, adenosine functions as an anti-inflammatory molecule in macrophages through the cAMP/PKA pathway [45, 46]. This effect can occur through the down-regulation of NF- κ B activity either by PKA [47] or CREB [28]. Surprisingly, in the present study, we did not observe any effect of adenosine produced by *S. aureus* on IL-8 secretion, regulated by NF- κ B (Supplementary Figure 2B). In addition, inhibition of A2a or A2b adenosine receptors and PKA had no effect on IL-8 secretion (Supplementary Figure 2D, F). These results suggest that the cAMP/PKA specifically regulates sPLA2-IIA expression. These data were consistent with our previous observations showing that adenylate cyclases from *B. anthracis* and *B. pertussis*, that raises cAMP levels, had no effect on IL-8 production by AMs, but inhibits sPLA2-IIA expression [11, 30]. Nonetheless, *S. aureus* adenosine may regulate other inflammatory mediators. Indeed, recent works highlighted the essential role of phagocytosis and PGN/NOD2 in IL1- β secretion [40, 48], a key inflammatory cytokine in the host response to *S. aureus* [49]. Here we showed that adenosine decreased *S. aureus* phagocytosis through A2aR (Figure 4D) that affects subsequent PGN/NOD2 interaction, which may impair IL1- β secretion. But in a sharp contrast, others showed that adenosine signaling was

required to induce IL1- β secretion through the same A2aR [46, 50]. Thus, it would be interesting to investigate the role of adenosine produced by *S. aureus* on IL-1 β secretion.

In conclusion, our work highlights for the first time that upon its phagocytosis *S. aureus* is sensed by AMs to induce sPLA2-IIA expression via NOD2-dependent pathway. This represents a new pathway used by the host to eliminate *S. aureus* via sPLA2-IIA. However, we also showed that *S. aureus* is able to subvert sPLA2-IIA expression through adenosine-dependent process. This allows *S. aureus* to escape phagocytosis and to reduce sPLA2-IIA expression, promoting *S. aureus* survival in the pulmonary microenvironment (Figure 7).

FUNDING

This work was supported by Domaine d'intérêts Majeur-Maladies Infectieuses from the Région Ile de France and Vaincre la mucoviscidose.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Pr. D. Missiakas (University of Chicago, Chicago, IL, USA) for providing the *S. aureus* Newman WT and $\Delta adsA$ strains; Dr. Tarek Msadek (Institut Pasteur, Paris, France) for the different WT strains of *S. aureus*. E. P. was supported by a PhD fellowship from “Domaine d'Intérêt Majeur-Maladies Infectieuses” from the Region Ile-de-France.

POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

All authors: no reported conflicts of interest.

REFERENCES

1. Gonzalez BE, Hulten KG, Dishop MK, et al. Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **2005**; 41:583-90.
2. Rubinstein E, Kollef MH, Nathwani D. Pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **2008**; 46 Suppl 5:S378-85.
3. Defres S, Marwick C, Nathwani D. MRSA as a cause of lung infection including airway infection, community-acquired pneumonia and hospital-acquired pneumonia. *Eur Respir J* **2009**; 34:1470-6.
4. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* **2000**; 165:5392-6.
5. Bubeck Wardenburg J, Williams WA, Missiakas D. Host defenses against *Staphylococcus aureus* infection require recognition of bacterial lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103:13831-6.
6. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **2003**; 278:8869-72.
7. Hruz P, Zinkernagel AS, Jenikova G, et al. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through alpha-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**; 106:12873-8.
8. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **2005**; 307:731-4.
9. Volz T, Nega M, Buschmann J, et al. Natural *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate

immune system exclusively in the presence of TLR signals. *FASEB J* **2010**; 24:4089-102.

10. Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* **2006**; 281:2005-11.

11. Wu Y, Raymond B, Goossens PL, et al. Type-IIA secreted phospholipase A2 is an endogenous antibiotic-like protein of the host. *Biochimie* **2010**; 92:583-7.

12. Gronroos JO, Laine VJ, Nevalainen TJ. Bactericidal group IIA phospholipase A2 in serum of patients with bacterial infections. *J Infect Dis* **2002**; 185:1767-72.

13. Gimenez AP, Wu YZ, Paya M, Delclaux C, Touqui L, Goossens PL. High bactericidal efficiency of type iia phospholipase A2 against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin. *J Immunol* **2004**; 173:521-30.

14. Koduri RS, Gronroos JO, Laine VJ, et al. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *J Biol Chem* **2002**; 277:5849-57.

15. Mover E, Wu Y, Lambeau G, Touqui L, Areschoug T. A novel bacterial resistance mechanism against human group IIA-secreted phospholipase A2: role of *Streptococcus pyogenes* sortase A. *J Immunol* **2011**; 187:6437-46.

16. Qu XD, Lehrer RI. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* **1998**; 66:2791-7.

17. Laine VJ, Grass DS, Nevalainen TJ. Protection by group II phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* **1999**; 162:7402-8.

18. Mover E, Wu Y, Lambeau G, Kahn F, Touqui L, Areschoug T. Secreted group IIA phospholipase A2 protects humans against the group B streptococcus: experimental and clinical evidence. *J Infect Dis* **2013**; 208:2025-35.
19. Piris-Gimenez A, Paya M, Lambeau G, et al. In vivo protective role of human group IIA phospholipase A2 against experimental anthrax. *J Immunol* **2005**; 175:6786-91.
20. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* **2005**; 3:948-58.
21. Baxt LA, Garza-Mayers AC, Goldberg MB. Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Science* **2013**; 340:697-701.
22. McCarthy AJ, Lindsay JA. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiol* **2010**; 10:173.
23. Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas DM. Enzymatic properties of *Staphylococcus aureus* adenosine synthase (AdsA). *BMC Biochem* **2011**; 12:56.
24. Thammavongsa V, Kern JW, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses. *J Exp Med* **2009**; 206:2417-27.
25. Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science* **2013**; 342:863-6.
26. Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2008**; 7:759-70.
27. Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2008**; 39:127-32.

28. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* **2010**; 185:6413-9.
29. Menschikowski M, Hagelgans A, Gussakovsky E, Kostka H, Paley EL, Siegert G. Differential expression of secretory phospholipases A2 in normal and malignant prostate cell lines: regulation by cytokines, cell signaling pathways, and epigenetic mechanisms. *Neoplasia* **2008**; 10:279-86.
30. Raymond B, Leduc D, Ravaux L, et al. Edema toxin impairs anthracidal phospholipase A2 expression by alveolar macrophages. *PLoS Pathog* **2007**; 3:e187.
31. Arbibe L, Vial D, Rosinski-Chupin I, et al. Endotoxin induces expression of type II phospholipase A2 in macrophages during acute lung injury in guinea pigs: involvement of TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced type II phospholipase A2 synthesis. *J Immunol* **1997**; 159:391-400.
32. Park JH, Kim YG, McDonald C, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* **2007**; 178:2380-6.
33. Wu YZ, Medjane S, Chabot S, et al. Surfactant protein-A and phosphatidylglycerol suppress type IIA phospholipase A2 synthesis via nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**; 168:692-9.
34. Raymond B, Ravaux L, Memet S, et al. Anthrax lethal toxin down-regulates type-IIA secreted phospholipase A(2) expression through MAPK/NF-kappaB inactivation. *Biochem Pharmacol* **2010**; 79:1149-55.
35. Antonio V, Brouillet A, Janvier B, et al. Transcriptional regulation of the rat type IIA phospholipase A2 gene by cAMP and interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells: interplay of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), nuclear factor-kappaB and Ets transcription factors. *Biochem J* **2002**; 368:415-24.

36. Kapetanovic R, Parlato M, Fitting C, Quesniaux V, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Mechanisms of TNF induction by heat-killed *Staphylococcus aureus* differ upon the origin of mononuclear phagocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **2011**; 300:C850-9.
37. Grass DS, Felkner RH, Chiang MY, et al. Expression of human group II PLA2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *J Clin Invest* **1996**; 97:2233-41.
38. Eerola LI, Surrel F, Nevalainen TJ, Gelb MH, Lambeau G, Laine VJO. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim Biophys Acta* **2006**; 1761:745-56.
39. Touqui L, Paya M, Thouron F, et al. *Neisseria meningitidis* pili induce type-IIA phospholipase A2 expression in alveolar macrophages. *FEBS Lett* **2005**; 579:4923-7.
40. Shimada T, Park BG, Wolf AJ, et al. *Staphylococcus aureus* evades lysozyme-based peptidoglycan digestion that links phagocytosis, inflammasome activation, and IL-1 β secretion. *Cell host & microbe* **2010**; 7:38-49.
41. Divangahi M, Mostowy S, Coulombe F, et al. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. *J Immunol* **2008**; 181:7157-65.
42. Weingart CL, Weiss AA. *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun* **2000**; 68:1735-9.
43. Yeager LA, Chopra AK, Peterson JW. *Bacillus anthracis* edema toxin suppresses human macrophage phagocytosis and cytoskeletal remodeling via the protein kinase A and exchange protein activated by cyclic AMP pathways. *Infect Immun* **2009**; 77:2530-43.
44. Liu P, Pian Y, Li X, et al. *Streptococcus suis* Adenosine Synthase Functions as an Effector in Evasion of PMN-mediated Innate Immunity. *J Infect Dis* **2014**.

45. Gonzales JN, Gorshkov B, Varn MN, et al. Protective effect of adenosine receptors against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2014**; 306:L497-507.
46. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* **2001**; 414:916-20.
47. Takahashi N, Tetsuka T, Uranishi H, Okamoto T. Inhibition of the NF- κ B transcriptional activity by protein kinase A. *Eur J Biochem* **2002**; 269:4559-65.
48. Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105:7803-8.
49. Miller LS, O'Connell RM, Gutierrez MA, et al. MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity* **2006**; 24:79-91.
50. Ouyang X, Ghani A, Malik A, et al. Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A(2)A receptor and the HIF-1 α pathway. *Nat Commun* **2013**; 4:2909.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *S. aureus* adenosine impairs sPLA2-IIA expression in primary AMs. (A) Guinea pigs alveolar macrophages (AMs) were infected with various strains of *S. aureus*. sPLA2-IIA expression was quantified 24 hours later after infection. Cells were incubated with LPS from *P. aeruginosa* for 24 hours as a positive control. (B) AMs were infected by the WT or the $\Delta adsA$ strain of *S. aureus* and sPLA2-IIA expression was quantified 24 hours later. Results were shown as mean \pm SEM from at least three independent experiments. ** $P < .01$ determined with one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test.

Figure 2. *S. aureus* induced-sPLA2-IIA expression is dependent on intracellular receptor NOD2. (A) AMs were stimulated for 24 hours with purified peptidoglycan (PGN, 10 μ g/ml) or lipoteichoic acid (LTA, 1 μ g/ml), before quantification of sPLA2-IIA expression 24 hours later. (B) sPLA2-IIA expression following 24h stimulation of AMs by MDP (10 μ g/ml), inactivated MDP control (MDPc, 10 μ g/ml), Pam3CSK4 (300ng/ml), MALP-2 (250nM) and CpG (1 μ g/ml). (C) Phagocytosis of the WT and the $\Delta adsA$ strain of *S. aureus* by AMs. (D) AMs pre-treated with cytochalasin D (5 μ M) or DMSO were infected by the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains and sPLA2-IIA expression was analyzed. Data were presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ determined with student's *t* test (C) or one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (A,B,D).

Figure 3. RIP2 and NF- κ B are involved in *S. aureus*-induced sPLA2-IIA expression. (A, B) AMs were pre-treated with (A) Gefitinib (500nM) or (B) BAY-117082 (3 μ M) for

30 minutes, before infection with the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains. Twenty-four hours later, sPLA2-IIA expression was evaluated. (C) I κ B α degradation following infection of AMs by the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strain. (D) MDP induced sPLA2-IIA expression was dependent on the binding of NF- κ B on the sPLA2-IIA. CHO cells were transfected with sPLA2-IIA WT promoter (WT) or sPLA2-IIA promoter in which the binding site of NF- κ B was deleted (Δ NF- κ B). Cells were then stimulated with MDP or MDPc (10 μ g/ml each) for 24 hours before luciferase assay. (A,B,D) Data were presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. ** P <.01, *** P <.001, **** P <.0001 determined with one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Blot presented in (C) was representative of at least three experiments.

Figure 4. Adenosine impairs sPLA2-IIA expression by inhibiting phagocytosis through adenosine receptors A2a and A2b-PKA pathway. (A) AMs were infected by the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains and CREB phosphorylation was assessed by immunoblotting 30 or 60 minutes after infection. (B) AMs were pre-treated with ZM241385 (1 μ M), PSB603 (1 μ M) or DMSO for 30min. Cells were then infected with the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains followed by analysis of sPLA2-IIA expression 24h later. (C) sPLA2-IIA expression by AMs pre-treated with H-89 (500nM) before infection with the WT or $\Delta adsA$ strain of *S. aureus*. (D, E) Phagocytosis assay of the *S. aureus* WT strain by AMs pre-treated with ZM241385 (1 μ M) and PSB603 (1 μ M) (D), or H-89 (500nM) (E). The $\Delta adsA$ strain was also included. (B-E) Data were presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. * P <.05, ** P <.01, *** P < 0.001 determined with student t-test or one-way ANOVA followed by

Bonferroni's multiple comparisons test. Blot presented in (A) was representative of at least three different experiments.

Figure 5. Adenosine-impaired phagocytosis is mediated through inhibition of p38 phosphorylation. (A) Western blot showing phosphorylation of p38 and ERK following infection of AMs by the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains (MOI 25). (B) Phagocytosis assay of the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains by AMs pre-treated with p38 inhibitor SB203580 (10 μ M). (C) sPLA2-IIA expression by AMs pre-treated with DMSO or SB203580 and infected with the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains. (D) Western blot analysis of p38 phosphorylation 30 minutes after infection by the WT strain of *S. aureus* of AMs treated with PKA (H-89, 500nM), A2a (ZM241385, 1 μ M) and A2b (PSB603, 1 μ M) inhibitors. (B,C) Data were presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. ** P <.01, *** P <.001 determined with student t-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. (A, D) Blots were representative of at least three experiments.

Figure 6. Adenosine secretion promotes *S. aureus* persistence in guinea pigs airways through inhibition of sPLA2-IIA. Guinea pigs were intranasally infected with 5x10⁷ CFUs of the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains. (A) Cells in BALs were counted and analysed by cytospin to evaluate the number of macrophages (M ϕ)/monocytes and neutrophils in PBS (n=6) and infected animals (n=8 per group). (B) sPLA2-IIA expression in cells isolated from BALs of the WT or $\Delta adsA$ -infected animals was quantified by quantitative PCR (n \geq 6 per group). (C) Bacterial loads in BALs of the WT or $\Delta adsA$ -infected animals 24 hours post-infection (n \geq 8 animals per group). (D) Bacterial loads in BALs of infected animal treated with vehicle (DMSO) or sPLA2

inhibitor (YM26734, 2mg/kg of body weight) ($n \geq 5$ per group). Data were presented as mean \pm SEM. * $P < .05$ determined using (B,C) Mann-Whitney test and by (D) Kruskal Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

Figure 7. Schematic representation of the regulation of sPLA2-IIA expression by *S. aureus*. *S. aureus* PGN and LTA activates p38-mediated phagocytosis by AMs through TLR2. This leads to bacterial engulfment, degradation in phagolysosomes and released of PGN. PGN is further sensed by NOD2 that signals *via* RIP2 and NF- κ B to induce sPLA2-IIA expression. To counteract this induction, *S. aureus* produces adenosine that is recognized by A2a and A2b adenosine receptors. The latter activated PKA that inhibits p38-mediated phagocytosis and subsequent sPLA2-IIA expression.

FIGURES

Figure 1

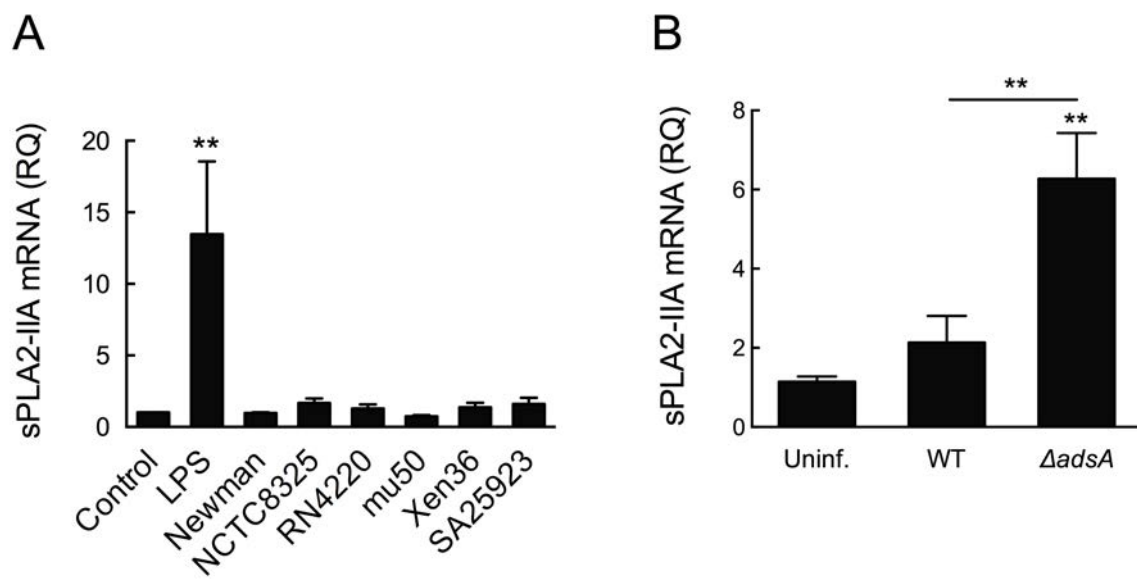


Figure 2

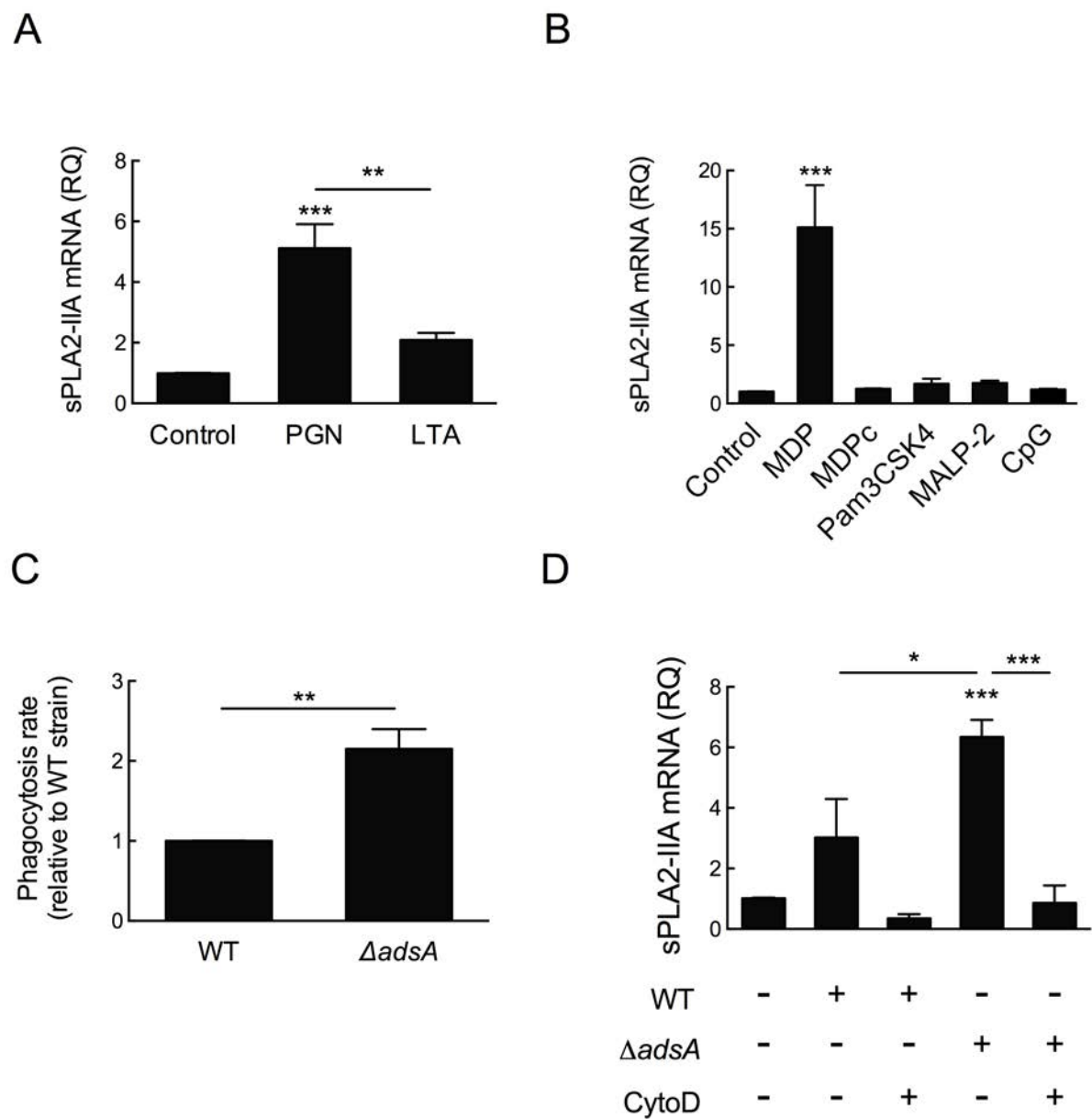


Figure 3

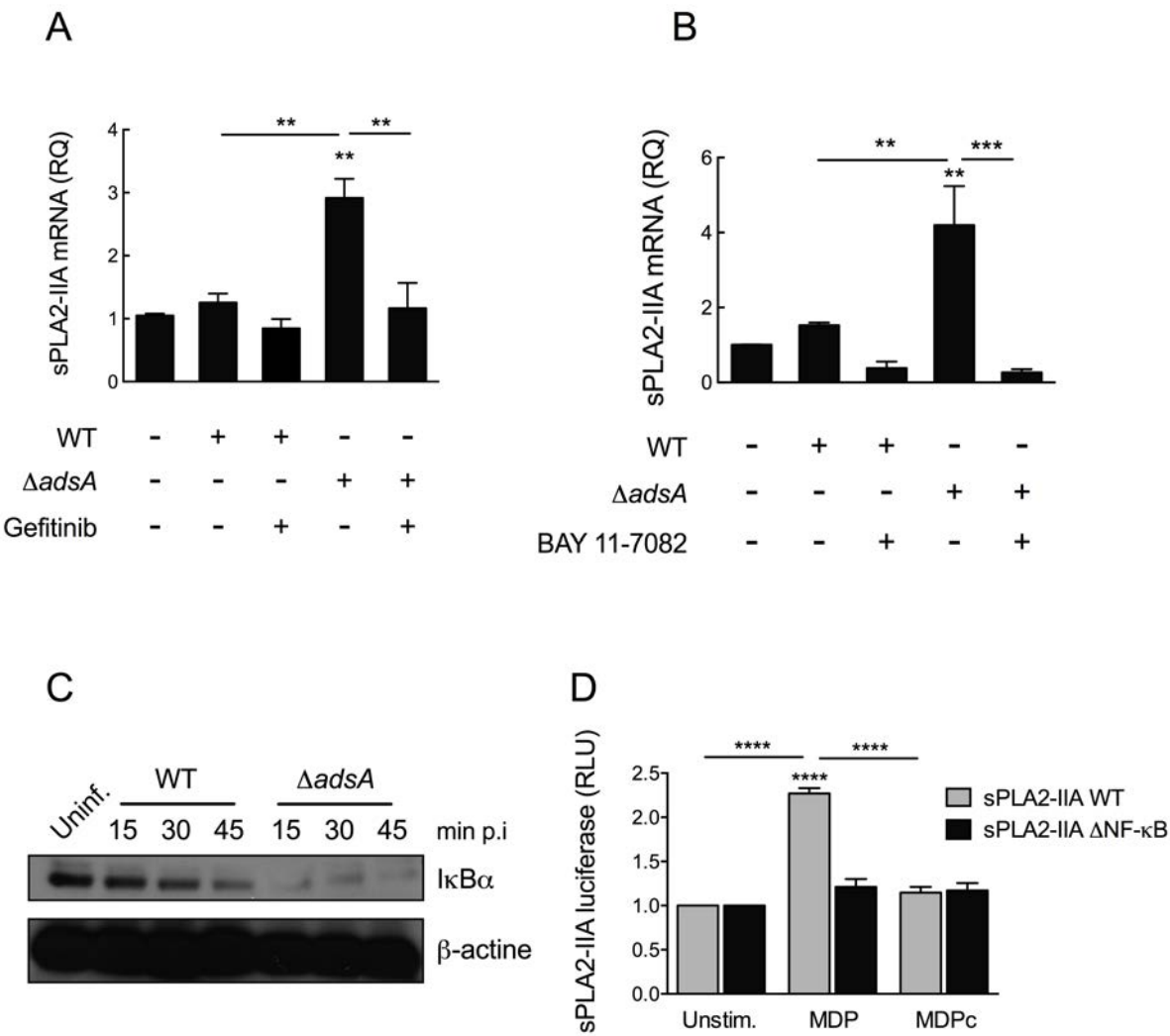


Figure 4

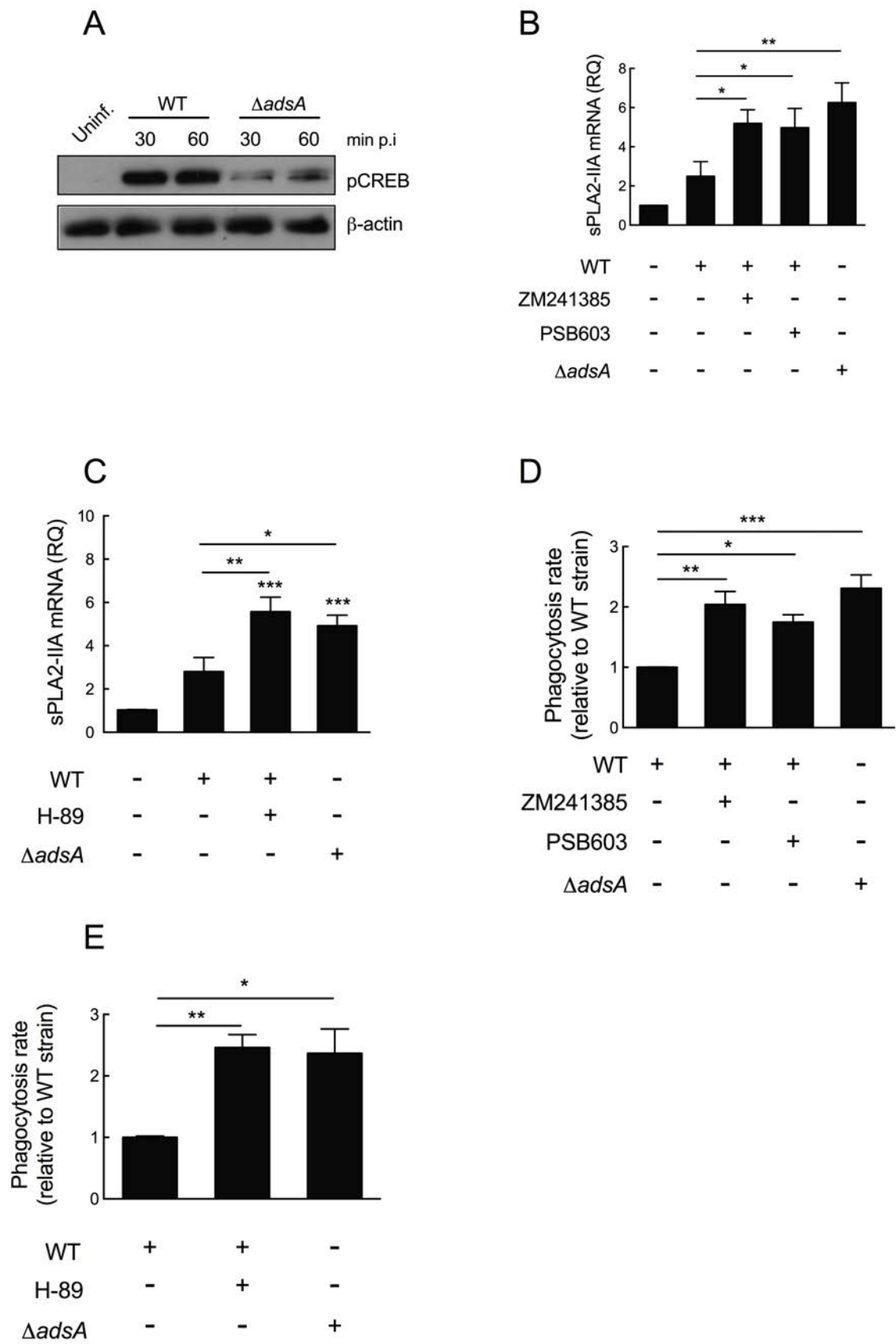


Figure 5

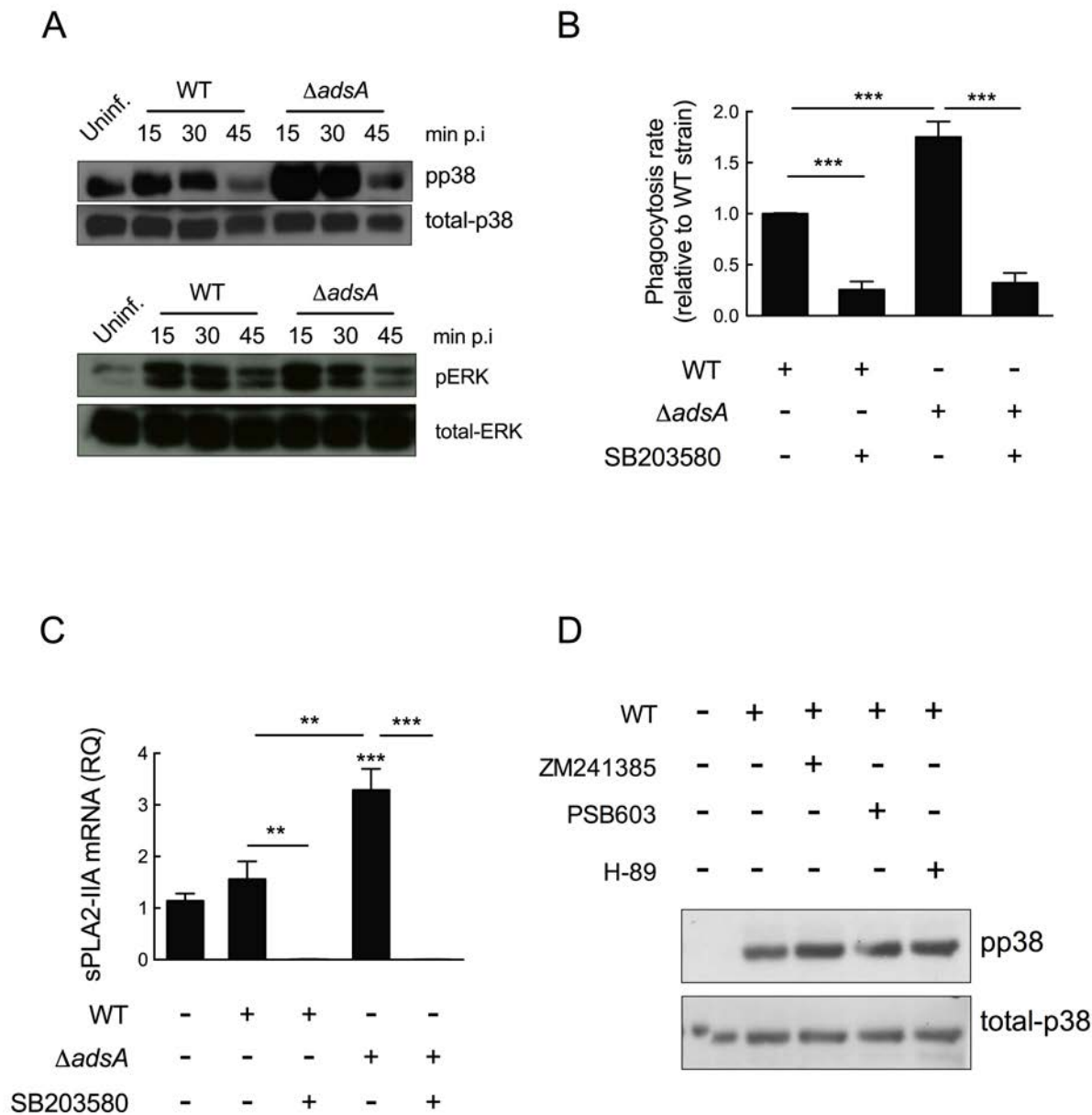
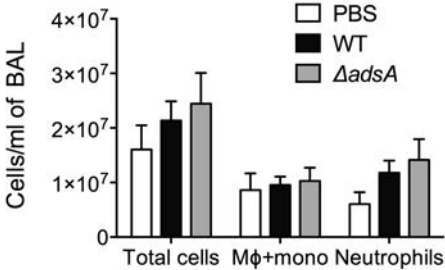
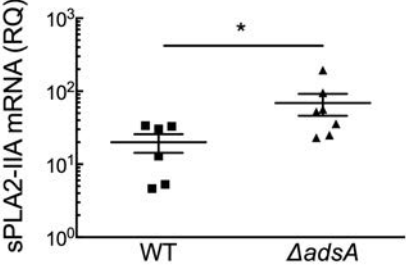


Figure 6

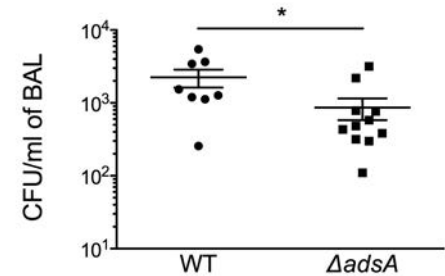
A



B



C



D

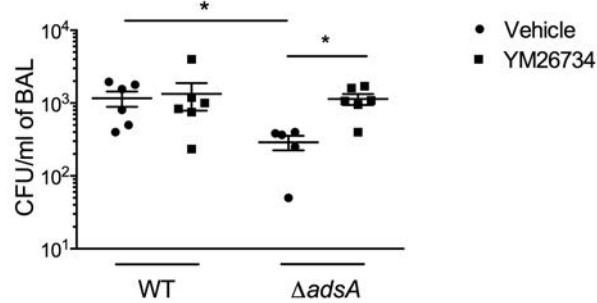
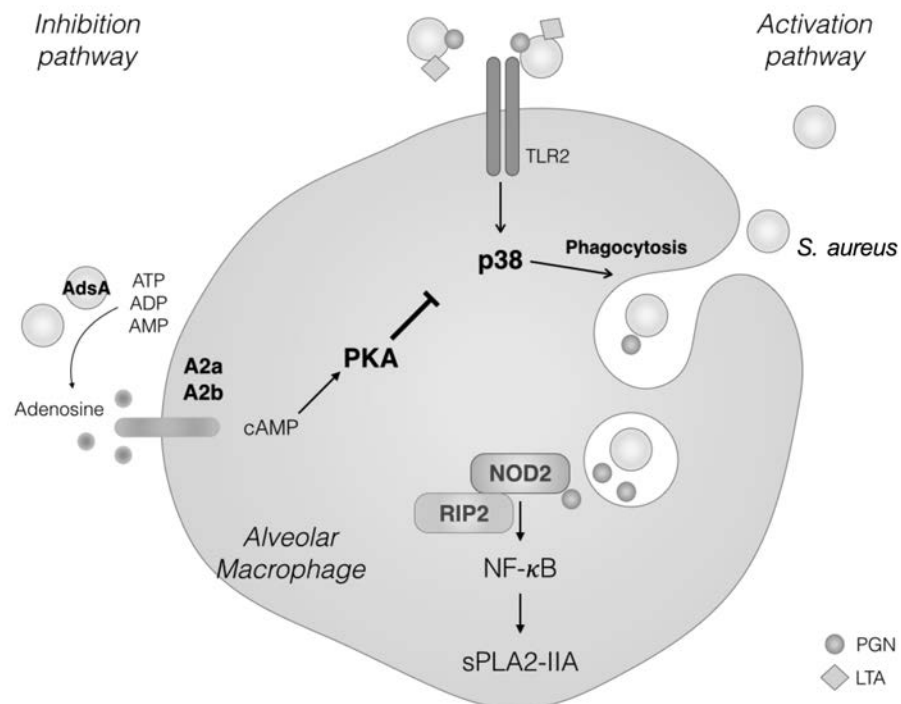


Figure 7



SUPPLEMENTAL MATERIAL

FIGURE LEGENDS

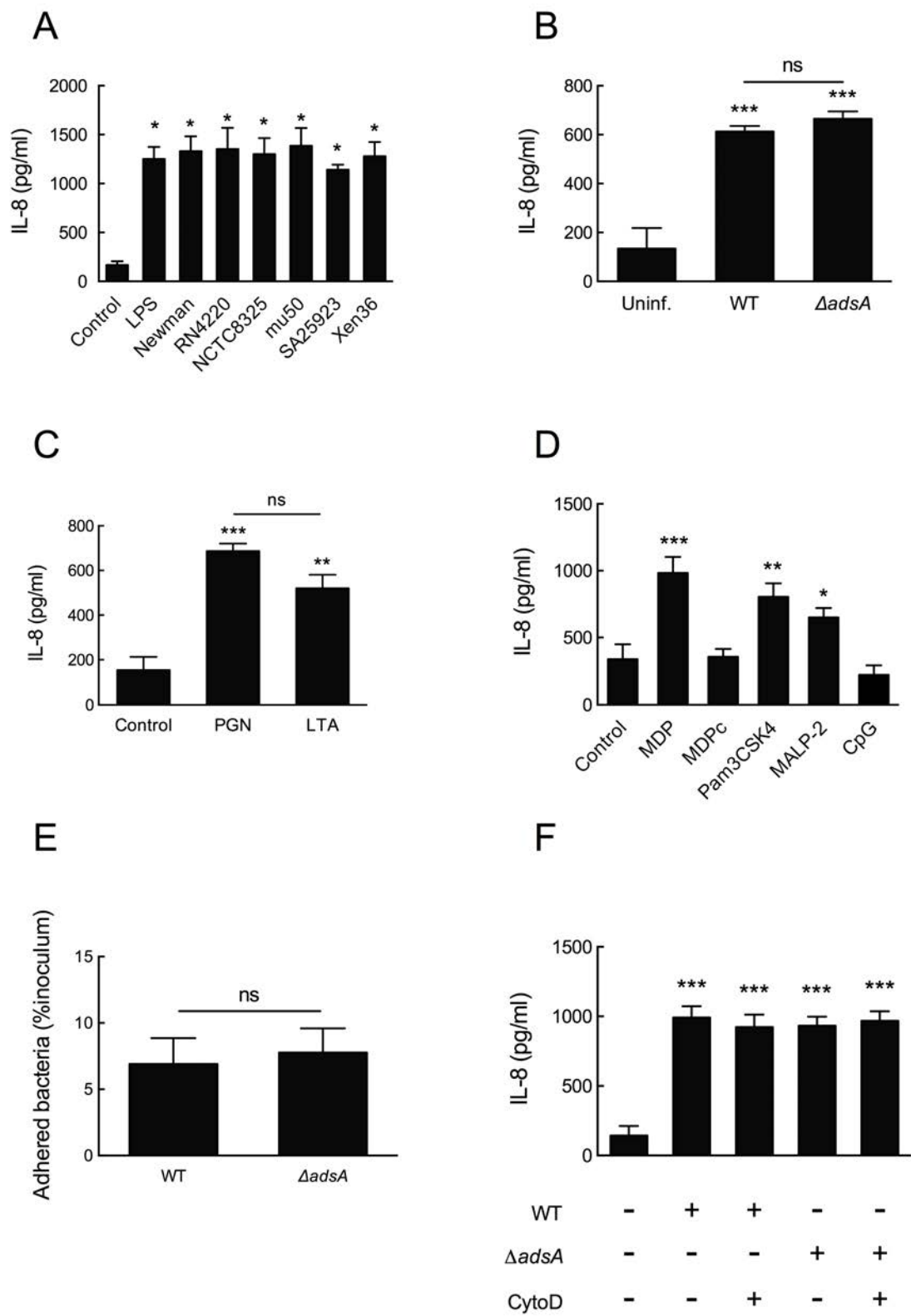
Supplementary Figure 1. *S. aureus*-induced IL-8 secretion by guinea pigs alveolar macrophages is not impaired by adenosine secretion. (A) Guinea pigs alveolar macrophages (AMs) were infected with various strains of *S. aureus* and IL-8 secretion was assayed as in supernatants 24 hours later. LPS from *P. aeruginosa* was used as a positive control. (B) AMs were infected by the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains and IL-8 production was quantified 24 hours later in culture supernatants. Different PAMPs of *S. aureus* induce IL-8 secretion by AMs. (C,D) IL-8 secretion in culture supernatants was assayed after stimulation for 24h with (C) purified peptidoglycan (PGN, 10 μ g/ml) or lipoteichoic acid (LTA, 1 μ g/ml), and (D) MDP (10 μ g/ml), inactivated MDP control (MDPc, 10 μ g/ml), Pam3CSK4 (300ng/ml), MALP-2 (250nM) and CpG (1 μ g/ml). IL-8 was measured in supernatants 24 hours later. (E) Adhesion assay of the WT and $\Delta adsA$ strains of *S. aureus* on AMs 30 min post infection. (F) AMs pre-treated by cytochalasin D or DMSO were infected by the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains and IL-8 secretion was measured in culture supernatants. Data were presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. * P <.05, ** P <.01, *** P <.001, determined with one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test or student's t test. ns : non significant.

Supplementary figure 2. NF- κ B, but not RIP2 kinase or cAMP pathway, mediates *S. aureus*-induced IL-8 secretion by AMs. (A, B) AMs were infected by WT or $\Delta adsA$ strain of *S. aureus* after pre-treatment with (A) gefitinib (500nM) and (B) BAY-117082 (3 μ M). Twenty-four hours later, IL-8 secretion was analysed by ELISA in culture supernatants. (C) AMs, pre-treated with inhibitors of A2a (ZM241385, 1 μ M) and A2b (PSB603, 1 μ M) adenosine receptors or DMSO, were infected with the WT strain of *S. aureus* and CREB phosphorylation was assessed by immunoblotting 30 minutes after infection. (D) IL-8 secretion by AMs infected with the *S. aureus* WT strain after pre-treatment with DMSO or inhibitors A2a and A2b adenosine receptors, A2a (ZM241385, 1 μ M) and A2b (PSB603, 1 μ M). AMs were also infected with the *S. aureus* $\Delta adsA$ mutant strain. (E) AMs, treated with PKA inhibitor H-89 (500nM) were infected with the WT strain of *S. aureus* and CREB phosphorylation was analysed by western blot 30 minutes after infection. (F) IL-8 secretion by AMs in culture supernatants 24 hours later after infection with the *S. aureus* WT or $\Delta adsA$ strains. Data were presented as

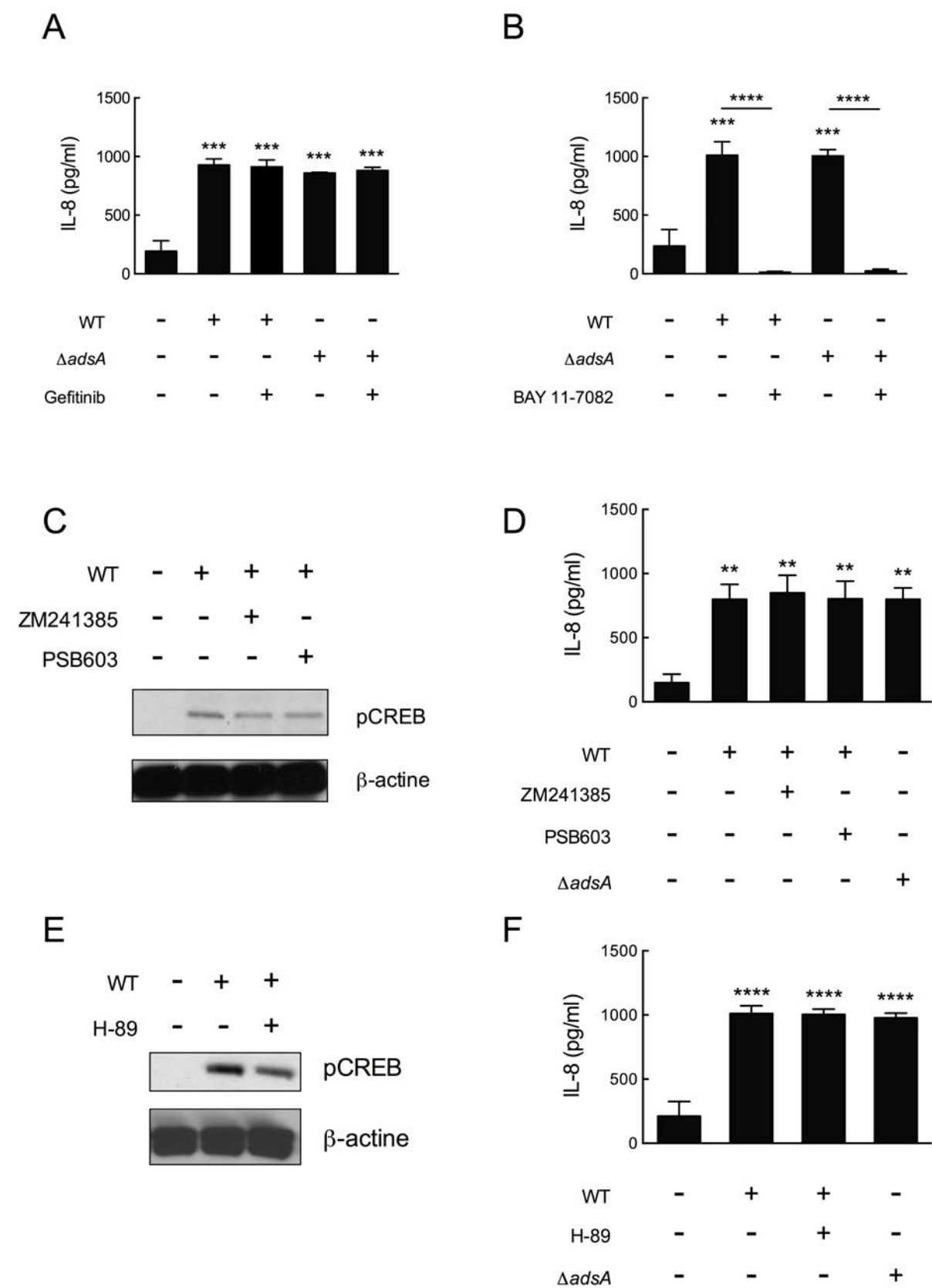
mean \pm SEM from at least three independent experiments. ** $P<.01$, *** $P<.001$, **** $P<.0001$ determined with one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test.

Supplementary figure 3. (A) MAPK p38 is involved in IL-8 secretion pathway by AMs. AMs, pre-treated with p38 inhibitor (SB203580, 10 μ M) or DMSO, were infected with the WT and Δ *adsA* strain of *S. aureus*. IL-8 secretion was measured in culture supernatants 24 hours later. (B) *S. aureus* adenosine does not regulate IL-8 secretion in guinea pig airways. Guinea pigs were infected intranasally with 5 $\times 10^7$ CFUs. Twenty four hours later, BALs were performed and IL-8 was measured by ELISA in BAL fluids. n=6 (PBS) and n=8 (WT and Δ *adsA* infected animals) guinea pigs per group. * $P<.05$, ** $P<.01$, *** $P<.001$ determine using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test or Kruskal Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

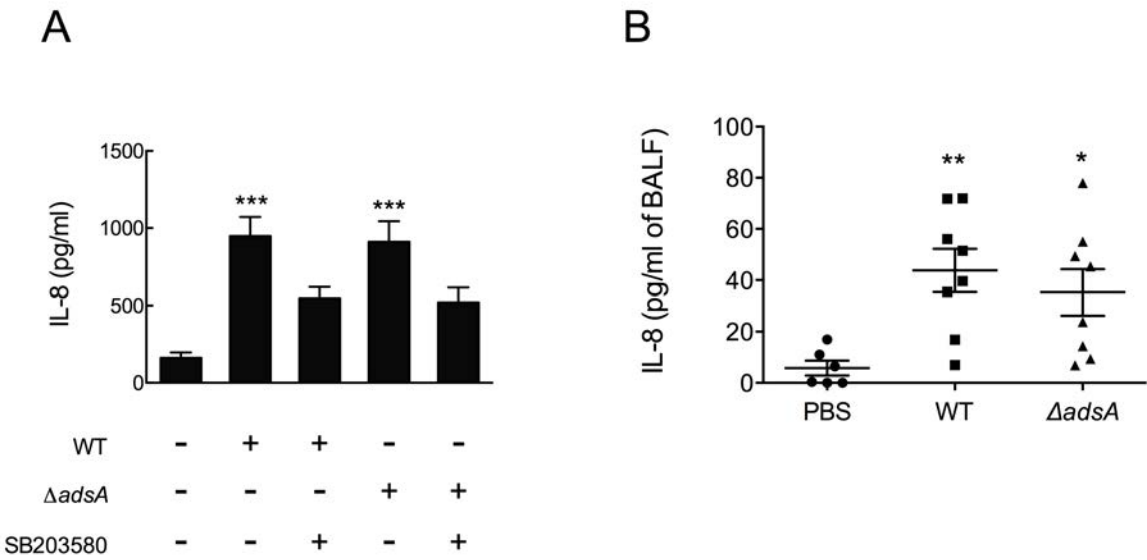
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Discussion générale.

I. Rôle de la sPLA2-IIA dans la mucoviscidose : induction de son expression par *P. aeruginosa*.

Nos résultats mettent en lumière un nouveau mécanisme dans lequel une bactérie élimine une autre bactérie en manipulant le système immunitaire inné de l'hôte. Dans ce mécanisme, nous mettons en évidence le rôle de la phospholipase A2 sécrétée de type IIA (sPLA2-IIA). Nous appliquons ce mécanisme à la mucoviscidose (MV).

La MV est caractérisée par une inflammation et une infection pulmonaires chroniques. En effet, les poumons de patients MV constituent un terrain favorable pour la colonisation par divers micro-organismes, comme des bactéries, virus et pathogènes fongiques, qui représentent la première cause de morbidité associée à cette pathologie [156]. Dans ce contexte, il a été observé une infection séquentielle des patients MV: les jeunes patients sont essentiellement colonisés par *S. aureus* et les adultes par *P. aeruginosa*. La colonisation par *P. aeruginosa* est associée à une diminution de la fonction respiratoire et une augmentation des dommages tissulaires [156]. Cependant, les mécanismes impliqués dans ce "switch" d'infection bactérienne restent encore inconnus. Nos résultats montrent que *P. aeruginosa* induit l'expression de la sPLA2-IIA par les cellules de l'hôte qui en retour participe à l'élimination de *S. aureus*.

La sPLA2-IIA est une protéine cationique de faible poids moléculaire, 14 kDa, dont la fonction principale repose sur son activité antibactérienne [250]. Parmi les PLA2 sécrétées, la sPLA2-IIA est celle qui possède la plus puissante activité antibactérienne [265]. L'activité antimicrobienne de la sPLA2-IIA est plus élevée envers les bactéries à Gram positif, comme par exemple *L. monocytogenes*, *S. pyogenes*, qu'envers les bactéries à Gram négatif, comme *B. cepacia*, *E. coli* [265, 280, 283]. Cette spécificité repose sur la plus grande accessibilité des phospholipides membranaires chez les bactéries à Gram positif comparé aux bactéries à Gram négatif, protégés par le LPS sur la membrane externe [269]. Cependant, ces résultats ont été obtenus *in vitro* et la signification physiopathologique de cette sélectivité reste mal connue. Dans nos résultats, nous mettons en évidence que la sPLA2-IIA participe à l'élimination de *S. aureus* des voies respiratoires des patients MV. La sPLA2-IIA est présente dans les expectorations de patients MV et les analyses par immunohistochimie démontrent que la sPLA2-IIA est exprimée en quantité supérieure chez les patients MV en comparaison des

patients non-MV. La sPLA2-IIA présente dans les expectorations de patients MV est capable d'éliminer spécifiquement *S. aureus* mais pas *P. aeruginosa*. Les modèles *in vivo* de souris transgéniques (surexpression de la sPLA2-IIA humaine) et cobayes (source endogène de sPLA2-IIA) ont confirmé la sélectivité d'élimination de *S. aureus* et l'induction de l'expression de la sPLA2-IIA par *P. aeruginosa*. En utilisant des cellules épithéliales issues de patients MV, nous avons démontré que *P. aeruginosa* induisait l'expression de la sPLA2-IIA par l'injection de la toxine ExoS *via* le système de sécrétion de type III. ExoS active le facteur de transcription KLF2 qui induit l'expression de la sPLA2-IIA.

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer l'élimination de *S. aureus* des voies respiratoires de patients MV. Premièrement, l'utilisation d'antibiotiques visant principalement à éradiquer *P. aeruginosa* peut également éliminer *S. aureus* [303]. Cependant, les antibiotiques utilisés contre les bactéries à Gram négatifs ne sont pas efficaces contre les bactéries à Gram positif et l'apparition de souches résistantes de *S. aureus* est souvent observé dans la mucoviscidose [304]. Deuxièmement, *P. aeruginosa* sécrète des molécules capables de lyser *S. aureus*, comme la staphylolysine LasA, une protéase qui clive les ponts polyglycines du peptidoglycane [53, 54]. Bien que son rôle ait été démontré *in vitro* [51] et *in vivo* [52], nous n'avons pas retrouvé ces observations dans nos résultats. De plus, LasA ne semble pas ou peu produite par les souches de *P. aeruginosa* issues de patients MV contrairement à LasB [305]. Enfin, des modèles de co-culture de biofilm entre *P. aeruginosa* et *S. aureus* suggèrent que *P. aeruginosa* favorise la formation de biofilm de *S. aureus* [306]. Nous avons postulé que la défense innée de l'hôte pouvait également participer à l'élimination de *S. aureus* des voies respiratoires de patients MV. Cependant, la mutation du CFTR affecte l'élimination des bactéries des voies respiratoires [157, 224]. En effet, Smith *et al.*, ont démontré que *P. aeruginosa* et *S. aureus* étaient moins éliminés par le liquide de surface provenant de cellules MV comparé à celui de patient non MV [224]. Ces mêmes auteurs ont démontré que la diminution de l'effet bactéricide était due à des concentrations élevées en NaCl et que la réduction des concentrations en sels restaurait l'effet bactéricide [224]. Cependant, la sPLA2-IIA est active même lorsque les concentrations en sels sont élevées comme dans les expectorations de patients MV [283]. La réduction de l'effet bactéricide a été confirmée récemment *ex vivo* dans le modèle du porc MV, même si ces auteurs ne retrouvent pas l'augmentation des concentrations en NaCl observée précédemment [225]. Dans cet article, les auteurs ont démontré que les porcs MV présentaient une diminution du pH du liquide de surface de l'épithélium, réduisant l'activité du lysozyme et de la lactoferrine envers *S. aureus* et *E. coli*, mais n'affectant pas la production des peptides

antimicrobiens. Il aurait sans doute été plus judicieux de choisir *P. aeruginosa* comme modèle. Lorsque le pH est augmenté, l'effet bactéricide du liquide de surface est restauré [225]. Malgré tout, ces auteurs ont observé une diminution de la survie bactérienne dans les voies aériennes des porcs MV, suggérant que des molécules antibactériennes étaient actives.

Lorsque nous avons recherché les sources de sPLA2-IIA dans les voies respiratoires, nous avons observé un marquage de forte intensité pour les cellules épithéliales et les neutrophiles. Les cellules épithéliales ont déjà été identifiées comme une source importante de sPLA2-IIA dans le passé [300]. Cependant le rôle des neutrophiles dans la production de sPLA2-IIA est controversé. D'autres études suggèrent que la sPLA2-IIA est internalisée en même temps que les bactéries ou soit stockée dans les granules des neutrophiles et jouerait un rôle bactéricide intracellulaire [276, 307].

Nous avons également voulu vérifier si la mutation du CFTR induisait une augmentation de l'expression de la sPLA2-IIA à l'état basal. En effet, dans le passé, Medjane et al. ont montré une augmentation de l'activité PLA2 dans les cellules IB3-1 (F508del-CFTR) comparées aux cellules contrôles C-38 (WT-CFTR) [300]. Dans notre étude nous avons travaillé sur cellules primaires, en interface air-liquide, issues de patients MV en comparaison à des cellules primaires issues de patients non MV. Lorsque nous avons analysé l'expression dans le lysat cellulaire, nous n'avons pas trouvé de différence d'expression de la sPLA2-IIA à l'état basal. En revanche, après infection par *P. aeruginosa* les cellules épithéliales non MV semblent exprimer la sPLA2-IIA de manière supérieure, même s'il n'y a pas de différence significative. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat. Premièrement, les cellules épithéliales MV produisent plus de mucus à leur surface, pouvant diminuer le contact entre les bactéries et les cellules épithéliales [308]. Le contact cellulaire est nécessaire pour induire l'expression du système de sécrétion de type 3 [309] qui participe à l'induction de l'expression de la sPLA2-IIA. Deuxièmement, nous avons démontré dans ce travail que l'expression de la sPLA2-IIA était dépendante du facteur de transcription KLF2. Des travaux récents ont mis en évidence par immunofluorescence que l'expression de KLF2 était diminué dans les tissus de patients MV comparés à ceux de patients non-MV, suite à l'infection par *P. aeruginosa* [118]. KLF2 est un facteur anti-inflammatoire [115, 116, 310]. Plusieurs études ont démontré un antagonisme entre NF- κ B et KLF2, l'un inhibant l'activité de l'autre et inversement, pouvant expliquer ce rôle anti-inflammatoire [117, 118]. Il a été suggéré, bien que controversé, que la mutation du CFTR déréprime l'activité de NF- κ B, conduisant à une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires [229, 230], hypothèse que nous validons dans nos résultats. De fait, la mutation du CFTR déréprimerait

l'activité de NF- κ B, diminuant celle de KLF2 [118], ce qui pourrait expliquer cette tendance observée sur l'expression de la sPLA2-IIA.

Le système de sécrétion de type III est un système présent chez les bactéries à Gram négatif permettant d'injecter directement dans la cellule hôte différentes toxines (ou effecteurs). *P. aeruginosa* injecte 4 toxines: ExoS, ExoT, ExoY et ExoU [85]. Dans les souches de laboratoire que nous avons étudiées, ExoU n'est pas exprimée, mais il serait intéressant de tester une souche possédant cette toxine, comme PA14 ou PA103. Nos travaux ont permis de mettre en évidence le rôle de la toxine ExoS dans l'induction de l'expression de la sPLA2-IIA, *via* son domaine ADPRT. Le domaine ADPRT cible de nombreuses protéines de l'hôte, mais les deux principales sont Ras et le complexe Ezrine-Radixine-Moesine [103, 108]. ExoS induit l'expression du facteur de transcription KLF2 dans les cellules épithéliales pulmonaires [114]. Des travaux suggèrent que l'expression de KLF2 dans les cellules épithéliales est dépendante de l'inactivation de RhoA [119]. Cependant, nos résultats suggèrent que l'induction de KLF2 par ExoS est dépendante d'une voie de signalisation différente car ExoT a également pour cible RhoA [120]. De plus, RhoA n'est pas une cible du domaine ADPRT [64]. ExoS est connue pour inhiber la MAPK ERK et la protéine Akt et pour activer la MAPK JNK [311]. Cette voie de signalisation constitue une piste intéressante pour approfondir les mécanismes. En effet, il existe un antagonisme entre l'activation de la kinase PI3, qui se trouve en amont d'Akt, et l'activation de KLF2 : l'inhibition de la kinase PI3 par l'inhibiteur LY294002 diminue la dégradation de l'ARNm de KLF2 [312]. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la toxine ExoS puisse activer les cellules de l'hôte par une autre voie, comme il a pu être montré avec les neutrophiles, reconnaissant la toxine ExoS *via* le TLR4 et le TLR2 [111].

Nous avons observé que la délétion du SST3 et de la toxine ExoS augmentait la sécrétion d'IL8 par les cellules épithéliales IB3-1. Il a été suggéré par Okuda *et al.*, que la sérine protéase MucD, dont l'expression et la sécrétion sont régulées par ExoS, dégraderait l'IL8 [313]. Cet argument pourrait également expliquer pourquoi cette différence n'est pas observée avec les cellules primaires. Ces dernières sont infectées au pôle apical et l'IL8 est mesurée au pôle basal, ce qui la rend inaccessible à l'action de MucD. Contrairement aux cellules de lignée, cultivées en milieu liquide, où la protéine MucD sécrétée par *P. aeruginosa* peut dégrader l'IL8. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que ce processus est dépendant de l'inhibition de l'activation de ERK et de la voie kinase PI3/AKT, ces deux kinases étant importantes pour la sécrétion d'IL8 [314]. Enfin, dernière hypothèse, nous

pensons que le facteur KLF2, aux propriétés anti-inflammatoires, puisse également diminuer la sécrétion d'IL8 en inhibant l'activité de NF- κ B [118, 310].

De nombreux travaux suggèrent que l'expression du T3SS de *P. aeruginosa* soit perdue lors de l'établissement de l'infection chronique [85, 130, 156]. Ce mécanisme peut être dû à la mutation du gène *mucA* [31]. MucA est un répresseur de la synthèse des alginate, qui confèrent l'aspect mucoïde à *P. aeruginosa* [154]. Cette conversion au phénotype mucoïde peut être due aux conditions oxydantes [244], à des mutations spontanées [154] ou comme observé plus récemment, à la présence des peptides antimicrobiens, dont la cathélicidine [245, 246]. Cependant, différents travaux montrent la présence de bactéries possédant un SST3 fonctionnel, même à un stade de colonisation chronique [315]. De plus, les propriétés chélatrices du microenvironnement dans les biofilms de *P. aeruginosa* peuvent induire la sécrétion de la toxine ExoS, suggérant que cette dernière puisse être exprimée dans des stades de colonisation chronique [316]. Enfin, de nouvelles études de séquençage ont mis en évidence une diversité importante des souches de *P. aeruginosa*, suggérant que plusieurs phénotypes/génotypes peuvent exister au sein d'un même patient [242, 243]. Bien que le SST3 puisse être perdu au cours de l'établissement de l'infection chronique, il n'est pas à exclure que d'autres facteurs de virulence bactériens puissent intervenir pour induire l'expression de la sPLA2-IIA. En effet, la conversion à la mucoïdie entraîne la sécrétion d'alginate, des polymères osidiques, qui peuvent influencer la réponse immunitaire innée [33, 154]. De plus, Beaudoin *et al.*, ont mis en évidence que le passage des bactéries au mode biofilm pouvait également faire apparaître de nouveaux facteurs de virulence reconnus par le TLR2 et par le TLR5 [199, 204].

Nous avons dosé l'activité sPLA2 et étudié la mortalité des bactéries dans les expectorations de patients en utilisant dans un premier temps l'inhibiteur YM26734. Ce composé est un inhibiteur non spécifique de la sPLA2-IIA, pouvant également affecter l'activité d'autres PLA2 sécrétées ou bactériennes. C'est pourquoi nous avons étudié l'effet de l'anticorps neutralisant, spécifique de la sPLA2-IIA [281] ou l'inhibiteur RO032007A, plus spécifique de la sPLA2-IIA que le YM26734 [317]. L'application de ces deux composés a inhibé presque totalement la lyse des bactéries, mais n'a pas aboli l'activité sPLA2, suggérant que d'autres sPLA2 peuvent également être présentes, mais que seule la sPLA2-IIA est impliquée dans l'élimination spécifique de *S. aureus*. Cependant, nous pensons que des phospholipases bactériennes sont présentes du fait que nous n'avons pas pu détecter ces autres sPLA2 humaines dans nos échantillons, bien qu'il ait été démontré que certaines soient

exprimées dans le poumon et assurent un rôle pro- ou anti- inflammatoire. Parmi les autres PLA2 sécrétées, certaines possèdent une activité bactéricide *in vitro*, comme la sPLA2-V, -X ou -XIIA [265]. Leur effet antibactérien a également été observé dans des modèles d'infection pulmonaire *in vivo* [261]. Par exemple, dans les modèles d'asthme, la sPLA2-X augmente la synthèse de LTB₄, contribuant à l'inflammation [254]. Mais dans notre cas, les concentrations requises pour observer un effet bactéricide ne sont plus physiologiques.

L'utilisation de peptides antimicrobiens constitue une approche possible pour traiter les infections bactériennes dans la MV [318]. Cependant, l'utilisation de la sPLA2-IIA pour traiter les patients MV soulève plusieurs questions. L'activité bactéricide de la sPLA2-IIA est plus élevée contre *S. aureus* et très faible envers *P. aeruginosa*. Le traitement des patients avec la sPLA2-IIA favoriserait donc l'infection par *P. aeruginosa*, ce qui n'est pas envisageable. C'est pourquoi nous pouvons imaginer améliorer l'activité de la sPLA2-IIA pour qu'elle soit efficace également envers les bactéries à Gram négatif. Pour cela, nous pouvons tester différents mutants afin d'augmenter la pénétration de la sPLA2-IIA dans la membrane des bactéries à Gram négatif. Nous pouvons également imaginer l'administration de la sPLA2-IIA en combinaison avec d'autres protéines qui augmenterait son activité contre *P. aeruginosa*, comme la protéine BPI [276, 319].

Haemophilus influenzae est également une bactérie à Gram négatif fréquemment retrouvée chez les jeunes patients MV mais absente chez les adultes [156]. Nous avons donc recherché l'effet de la sPLA2-IIA *in vitro* envers cette bactérie. Comme d'autres bactéries à Gram négatif, *H. influenzae* résiste à l'action de la sPLA2-IIA (résultat non montré). De même, les niveaux de sPLA2-IIA étant maximum chez l'adulte, nous avons testé l'effet de la sPLA2-IIA sur les bactéries du complexe *Burkholderia*, des bactéries à Gram négatif qui apparaissent tardivement chez les patients MV. Ces bactéries sont résistantes à l'effet de la sPLA2-IIA (résultat non montré). Des travaux de Dubouix et al ont déjà mis en évidence un effet bactéricide de la sPLA2-IIA sur des isolats cliniques de *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. cepacia* provenant de patients MV. Mais les hautes concentrations utilisées, supérieures à 20µg/ml, ne permettaient pas d'observer une spécificité d'action [283].

Malgré la production de sPLA2-IIA dans les voies respiratoires de patients MV, *S. aureus* est capable de persister chez certains patients. Une explication possible serait que les niveaux de sPLA2-IIA ne permettent d'éliminer la totalité des bactéries présentes dans les poumons, ou que sa diffusion soit homogène dans le poumon à cause du mucus épais. De plus, la colonisation intermittente par *P. aeruginosa* observée chez les jeunes patients suggère que l'expression de la sPLA2-IIA induite par cette bactérie le soit également. Enfin, il a été

démontré que la mutation de l'acide téichoïque, composant de la paroi de *S. aureus*, confèrait une résistance à l'action de la sPLA2-IIA [320].

Enfin, nous ne pouvons pas exclure que certaines souches de *S. aureus* puissent également activer l'expression de la sPLA2-IIA, dans les macrophages ou cellules épithéliales. Le peptidoglycane des bactéries à Gram positif peut activer l'expression de la sPLA2-IIA dans les macrophages alvéolaires [301, 321]. De plus, certaines souches de *S. aureus* possèdent la toxine C3Stau, possédant un domaine ADPRT, capable d'activer le facteur de transcription KLF2 [322].

En conclusion, nous mettons en évidence un nouveau mécanisme dans lequel une bactérie manipule l'immunité innée de l'hôte afin d'éliminer une autre bactérie et nous l'appliquons à la dynamique du microbiome dans la mucoviscidose. Mais nous devons cependant garder à l'esprit que le microenvironnement pulmonaire dans la mucoviscidose est complexe et que de nombreux autres facteurs puissent intervenir pour participer à l'élimination de *S. aureus*.

II. *S. aureus* inhibe l'expression de la sPLA2-IIA dans les macrophages alvéolaires de cobaye : rôle de l'adénosine.

Chez le cobaye, les macrophages alvéolaires représentent la source majoritaire de sPLA2-IIA endogène dans les voies respiratoires [257]. Les expériences conduites dans la partie précédente suggèrent que *S. aureus* n'a pas d'effet sur l'induction de l'expression de la sPLA2-IIA. Cependant, il a été démontré que le peptidoglycane des bactéries à Gram positif étaient capable d'induire l'expression de la sPLA2-IIA [299]. Nous avons alors émis l'hypothèse que *S. aureus* était capable d'inhiber l'expression de la sPLA2-IIA afin de se protéger contre l'action de cette enzyme et de persister dans les voies respiratoires. Des résultats obtenus au laboratoire avaient déjà mis en évidence un mécanisme similaire avec la bactérie *B. anthracis*. Le bacille du charbon possède deux enzymes, la toxine létale (LT) et l'edema facteur (EF). Ces deux enzymes inhibent l'expression de la sPLA2-IIA dans les MA de cobayes en inhibant la voie des MAP kinases (LT) [302] et en augmentant les niveaux d'AMP cyclique [299]. Il a été récemment mis en évidence chez *S. aureus*, un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire, du à la sécrétion d'adénosine [323]. Ce mécanisme

est dépendant de la protéine AdsA, qui catalyse la transformation de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP en adénosine [324].

Dans notre modèle, la délétion du gène *adsA* chez *S. aureus* augmente l'expression de la sPLA2-IIA dans les MA de cobaye. Nous avons démontré que *S. aureus* induit l'expression de la sPLA2-IIA par un mécanisme dépendant de la phagocytose, impliquant la kinase p38. Le récepteur NOD2, reconnaissant les motifs MDP du peptidoglycane, est le récepteur intracellulaire impliqué dans ce processus. Nous avons montré que l'adénosine inhibe la phagocytose *via* les récepteurs de l'hôte A2a et A2b et la protéine kinase A (PKA), inhibant par la même occasion l'expression de la sPLA2-IIA.

S. aureus est reconnu par le système immunitaire principalement *via* deux récepteurs, le TLR2, membranaire, et NOD2, intracellulaire [325]. Nous avons utilisé les deux principaux facteurs de virulence de *S. aureus* reconnus par l'immunité innée, l'acide lipotéichoïque et le peptidoglycane [326]. Seul le peptidoglycane a induit l'expression de la sPLA2-IIA. Cependant, ce résultat ne permettait pas de discriminer le récepteur, TLR2 ou NOD2, car le peptidoglycane est reconnu par les deux récepteurs [327, 328], bien que la reconnaissance du peptidoglycane par le TLR2 soit controversée [329]. Nous avons utilisé le MDP, plus petit fragment du peptidoglycane reconnu par NOD2, ainsi que des agonistes synthétiques du TLR2, Pam3CSK4 (TLR2/1) et MALP-2 (TLR2/6). Nous avons ainsi mis en évidence l'induction de l'expression de la sPLA2-IIA par le MDP, démontrant le rôle essentiel de NOD2. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que d'autres composants de *S. aureus* puissent également induire l'expression de la sPLA2-IIA.

Ces résultats nous ont permis d'orienter la suite de nos recherches, car l'implication d'un récepteur intracellulaire suggère que la bactérie soit reconnue au niveau du cytoplasme. De plus, l'adénosine a déjà été montrée comme régulateur de la phagocytose pour *S. aureus* [323] et dans d'autres modèles *via* les récepteurs A2a [330], A2b [331] et la protéine kinase A [332]. Plusieurs travaux sur *B. pertussis* et *B. anthracis*, possédant des adénylates cyclases, suggèrent que l'inhibition de la phagocytose soit dépendante de l'augmentation des niveaux d'AMPc de l'hôte [333, 334]. Nous mettons en évidence que l'adénosine sécrétée par *S. aureus* induit la phosphorylation de CREB, un facteur de transcription activé par l'augmentation des niveaux d'AMPc. Ces résultats nous ont permis d'orienter nos recherches sur les récepteurs A2a et A2b, seuls récepteurs de l'adénosine à augmenter les niveaux d'AMPc [335]. De plus, nous montrons que la phagocytose par les macrophages est inhibée par les récepteurs A2a et A2b et la PKA. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet de l'adénosine sur la sécrétion d'IL8, allant à l'encontre de ses propriétés anti-inflammatoires

[336, 337]. Ces résultats suggèrent également que la voie AMPc/PKA n'interfère pas directement avec l'activation de NF- κ B, comme il a pu être suggéré par certains auteurs [338], renforçant les hypothèses émises par Raymond *et al.* [299]. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses quand au rôle de la PKA :

- un effet indirect en inhibant l'accès de certains facteurs de virulence à leur récepteur intracellulaire
- un effet sur le remodelage de la chromatine en régulant l'activité des histones déacétylases [339]. En effet, la régulation épigénétique semble jouer un rôle important dans la modulation de l'expression de la sPLA2-IIA [294]. La PKA inhiberait ainsi l'accès du promoteur de la sPLA2-IIA aux facteurs de transcription.

Ces résultats mettent une nouvelle fois en lumière le rôle ambivalent de l'AMP cyclique dans l'expression de la sPLA2-IIA. En fonction des tissus, l'AMPc peut être inducteur de l'expression de la sPLA2-IIA, comme dans les cellules musculaires lisses de rat [293], ou alors être inhibiteur dans les macrophages alvéolaires (ce travail et [299]).

Ces résultats peuvent être replacés dans le contexte de la MV, où *S. aureus* est un pathogène fréquemment retrouvé chez les jeunes patients [156]. La sécrétion d'adénosine par le staphylocoque pourrait constituer une explication au défaut d'élimination des bactéries dans les voies respiratoires des patients MV, dû au microenvironnement pulmonaire plutôt qu'à un défaut des neutrophiles eux-mêmes [237]. En effet, les expectorations des patients MV contiennent des concentrations d'adénosine proches de 10 μ M [340], concentrations suffisantes pour inhiber la phagocytose par les neutrophiles [323] et l'expression de la sPLA2-IIA par les MA. Des études supplémentaires sont cependant requises pour confirmer l'hypothèse que *S. aureus* contribuerait au défaut de l'immunité innée dans la MV, favorisant la persistance des bactéries, dont lui-même et *P. aeruginosa*.

Conclusions

Durant mes travaux de thèse, nous avons pu mettre en évidence deux mécanismes de régulation de l'expression de la sPLA2-IIA par des pathogènes bactériens.

Dans un premier temps, j'ai mis en évidence un nouveau mécanisme dans lequel une bactérie manipule le système de défense innée de l'hôte afin d'éliminer une autre bactérie. Dans ce processus appliqué à la mucoviscidose, *P. aeruginosa* induit l'expression de la sPLA2-IIA par les cellules épithéliales de l'hôte. La sPLA2-IIA est un puissant agent antibactérien, dont l'activité est sélective des bactéries à Gram positif comme *S. aureus*. La sPLA2-IIA participe ainsi à l'élimination de *S. aureus* des voies respiratoires des patients MV. La compréhension de ce phénomène permet de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la dynamique du microbiome pulmonaire dans la mucoviscidose.

Dans un second temps, j'ai mis en évidence un mécanisme d'échappement de la bactérie *S. aureus* à la réponse immunitaire innée pulmonaire, médiée par la sPLA2-IIA. Pour la première fois le rôle majeur de NOD2 dans la régulation de l'expression de la sPLA2-IIA a été illustré ainsi que l'inhibition par l'AMPc et la PKA au niveau pulmonaire.

En conclusion, ce travail illustre les différents mécanismes d'adaptation des bactéries à leur hôte, en étant soit inducteur, soit inhibiteur, de l'expression de la sPLA2-IIA, afin de persister dans l'organisme.

Références Bibliographiques

1. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **2000**; 406:959-64.
2. Shen K, Sayeed S, Antalis P, et al. Extensive genomic plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* revealed by identification and distribution studies of novel genes among clinical isolates. *Infect Immun* **2006**; 74:5272-83.
3. Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105:3100-5.
4. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43:1379-82.
5. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* **2002**; 95 Suppl 41:22-6.
6. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* **2001**; 183:5395-401.
7. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **1996**; 60:539-74.
8. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **2005**; 171:1209-23.
9. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol* **2005**; 3:601-10.
10. Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol* **2007**; 297:277-95.
11. Ernst RK, Yi EC, Guo L, et al. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **1999**; 286:1561-5.
12. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* **2003**; 3:169-76.
13. Bystrova OV, Knirel YA, Lindner B, et al. Structures of the core oligosaccharide and O-units in the R- and SR-type lipopolysaccharides of reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* O-serogroups. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2006**; 46:85-99.
14. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **1998**; 30:295-304.
15. Macnab RM. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **2003**; 57:77-100.
16. Doyle TB, Hawkins AC, McCarter LL. The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **2004**; 186:6341-50.
17. Feldman M, Bryan R, Rajan S, et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* **1998**; 66:43-51.
18. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med* **2012**; 18:509-19.
19. Irvin RT, Doig P, Lee KK, et al. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* pilus adhesin: confirmation that the pilin structural protein subunit contains a human epithelial cell-binding domain. *Infect Immun* **1989**; 57:3720-6.
20. Carter MQ, Chen J, Lory S. The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. *J Bacteriol* **2010**; 192:3249-58.
21. Kus JV, Tullis E, Cvitkovitch DG, Burrows LL. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology* **2004**; 150:1315-26.

22. Smedley JGr, Jewell E, Roguskie J, et al. Influence of pilin glycosylation on *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilus function. *Infect Immun* **2005**; 73:7922-31.
23. Tang H, Kays M, Prince A. Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect Immun* **1995**; 63:1278-85.
24. Schroeder TH, Zaidi T, Pier GB. Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM(1) on epithelial cells. *Infect Immun* **2001**; 69:719-29.
25. Li J, Johnson XD, Iazvovskaia S, Tan A, Lin A, Hershenson MB. Signaling intermediates required for NF-kappa B activation and IL-8 expression in CF bronchial epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **2003**; 284:L307-15.
26. Arlehamn CS, Evans TJ. *Pseudomonas aeruginosa* pilin activates the inflammasome. *Cell Microbiol* **2011**; 13:388-401.
27. Jyot J, Balloy V, Jouvion G, et al. Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. *The Journal of infectious diseases* **2011**; 203:1369-77.
28. Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protein & peptide science* **2012**; 13:831-42.
29. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International journal of medical microbiology : IJMM* **2010**; 300:534-43.
30. Wozniak DJ, Ohman DE. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *J Bacteriol* **1994**; 176:6007-14.
31. Wu W, Badrane H, Arora S, Baker HV, Jin S. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **2004**; 186:7575-85.
32. Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* **2005**; 56:309-22.
33. Mai GT, Seow WK, Pier GB, McCormack JG, Thong YH. Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. *Infect Immun* **1993**; 61:559-64.
34. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **2002**; 295:1487.
35. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **2006**; 59:1114-28.
36. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* **2008**; 4:e1000213.
37. Frances R, Munoz C, Zapater P, et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* **2004**; 53:860-4.
38. Benmohamed F, Medina M, Wu YZ, et al. Toll-Like Receptor 9 Deficiency Protects Mice against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *PLoS One* **2014**; 9:e90466.
39. Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* **2012**; 76:46-65.
40. Mayer ML, Sheridan JA, Blohmke CJ, Turvey SE, Hancock RE. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer 3O-C12 homoserine lactone provokes hyperinflammatory responses from cystic fibrosis airway epithelial cells. *PLoS One* **2011**; 6:e16246.

41. Allen L, Dockrell DH, Pattery T, et al. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* **2005**; 174:3643-9.
42. Denning GM, Wollenweber LA, Railsback MA, Cox CD, Stoll LL, Britigan BE. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun* **1998**; 66:5777-84.
43. Leidal KG, Munson KL, Denning GM. Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2001**; 25:186-95.
44. Denning GM, Railsback MA, Rasmussen GT, Cox CD, Britigan BE. *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *Am J Physiol* **1998**; 274:L893-900.
45. Doring G, Goldstein W, Roll A, Schiotz PO, Hoiby N, Botzenhart K. Role of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzymes in lung infections of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **1985**; 49:557-62.
46. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS One* **2011**; 6:e27091.
47. Cowell BA, Twining SS, Hobden JA, Kwong MSF, Fleiszig SMJ. Mutation of *lasA* and *lasB* reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. *Microbiology (Reading, Engl)* **2003**; 149:2291-9.
48. Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, Voulhoux R, Attree I, Huber P. VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells. *PLoS Pathog* **2014**; 10:e1003939.
49. Estrellas PS, Jr., Alionte LG, Hobden JA. A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient. *Curr Eye Res* **2000**; 20:157-65.
50. Alionte LG, Cannon BM, White CD, Caballero AR, O'Callaghan RJ, Hobden JA. *Pseudomonas aeruginosa* LasA protease and corneal infections. *Curr Eye Res* **2001**; 22:266-71.
51. Kessler E, Safrin M, Olson JC, Ohman DE. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *The Journal of biological chemistry* **1993**; 268:7503-8.
52. Barequet IS, Ben Simon GJ, Safrin M, Ohman DE, Kessler E. *Pseudomonas aeruginosa* LasA protease in treatment of experimental staphylococcal keratitis. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:1681-7.
53. Lache M, Hearn WR, Zyskind JW, Tipper DJ, Strominger JL. Specificity of a bacteriolytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **1969**; 100:254-9.
54. Brito N, Falcon MA, Carnicero A, Gutierrez-Navarro AM, Mansito TB. Purification and peptidase activity of a bacteriolytic extracellular enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* **1989**; 140:125-37.
55. Jorgensen R, Wang Y, Visschedyk D, Merrill AR. The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction. *EMBO reports* **2008**; 9:802-9.
56. Doring G, Muller E. Different sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and diphtheria toxin to enzymes from polymorphonuclear leukocytes. *Microb Pathog* **1989**; 6:287-95.
57. Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ, Vasil ML. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* **2004**; 53:1089-98.

58. Konig B, Vasil ML, Konig W. Role of haemolytic and non-haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in interleukin-8 release from human monocytes. *J Med Microbiol* **1997**; 46:471-8.
59. Holm BA, Keicher L, Liu MY, Sokolowski J, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J Appl Physiol* (1985) **1991**; 71:317-21.
60. Zulianello L, Canard C, Kohler T, Caille D, Lacroix JS, Meda P. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **2006**; 74:3134-47.
61. Hirayama T, Kato I. Mode of cytotoxic action of pseudomonal leukocidin on phosphatidylinositol metabolism and activation of lysosomal enzyme in rabbit leukocytes. *Infect Immun* **1984**; 43:21-7.
62. Fito-Boncompagni L, Chapalain A, Bouffartigues E, et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun* **2011**; 79:1176-86.
63. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **2006**; 4:811-25.
64. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* **2009**; 7:654-65.
65. Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P, Cornelis GR. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* **1994**; 176:1561-9.
66. Blaylock B, Riordan KE, Missiakas DM, Schneewind O. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol* **2006**; 188:3525-34.
67. Sorg JA, Blaylock B, Schneewind O. Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103:16490-5.
68. Koster M, Bitter W, de Cock H, Allaoui A, Cornelis GR, Tommassen J. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **1997**; 26:789-97.
69. Burghout P, Beckers F, de Wit E, et al. Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **2004**; 186:5366-75.
70. Journet L, Agrain C, Broz P, Cornelis GR. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **2003**; 302:1757-60.
71. Burns RE, McDaniel-Craig A, Sukhan A. Site-directed mutagenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system protein PscJ reveals an essential role for surface-localized residues in needle complex function. *Microb Pathog* **2008**; 45:225-30.
72. Galle M, Jin S, Bogaert P, Haegman M, Vandenabeele P, Beyaert R. The *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system has an exotoxin S/T/Y independent pathogenic role during acute lung infection. *PLoS One* **2012**; 7:e41547.
73. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**; 107:3076-80.
74. Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI, Flavell RA. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *The Journal of experimental medicine* **2007**; 204:3235-45.
75. Yahr TL, Hovey AK, Kulich SM, Frank DW. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene. *J Bacteriol* **1995**; 177:1169-78.
76. Shen DK, Quenee L, Bonnet M, et al. Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Environ Sci* **2008**; 21:103-9.
77. Finck-Barbancon V, Yahr TL, Frank DW. Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J Bacteriol* **1998**; 180:6224-31.

78. Brutinel ED, King JM, Marsden AE, Yahr TL. The distal ExsA-binding site in *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system promoters is the primary determinant for promoter-specific properties. *J Bacteriol* **2012**; 194:2564-72.
79. McCaw ML, Lykken GL, Singh PK, Yahr TL. ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol Microbiol* **2002**; 46:1123-33.
80. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**; 102:8006-11.
81. Zolfaghar I, Angus AA, Kang PJ, To A, Evans DJ, Fleiszig SM. Mutation of retS, encoding a putative hybrid two-component regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*, attenuates multiple virulence mechanisms. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **2005**; 7:1305-16.
82. Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, et al. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103:171-6.
83. Yahr TL, Wolfgang MC. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **2006**; 62:631-40.
84. Rocha CL, Coburn J, Rucks EA, Olson JC. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect Immun* **2003**; 71:5296-305.
85. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2001**; 147:2659-69.
86. Riese MJ, Barbieri JT. Membrane localization contributes to the in vivo ADP-ribosylation of Ras by *Pseudomonas aeruginosa* ExoS. *Infect Immun* **2002**; 70:2230-2.
87. Zhang Y, Barbieri JT. A leucine-rich motif targets *Pseudomonas aeruginosa* ExoS within mammalian cells. *Infect Immun* **2005**; 73:7938-45.
88. Zhang Y, Deng Q, Barbieri JT. Intracellular localization of type III-delivered *Pseudomonas* ExoS with endosome vesicles. *The Journal of biological chemistry* **2007**; 282:13022-32.
89. Zhang Y, Deng Q, Porath JA, Williams CL, Pederson-Gulrud KJ, Barbieri JT. Plasma membrane localization affects the RhoGAP specificity of *Pseudomonas* ExoS. *Cell Microbiol* **2007**; 9:2192-201.
90. Deng Q, Zhang Y, Barbieri JT. Intracellular trafficking of *Pseudomonas* ExoS, a type III cytotoxin. *Traffic* **2007**; 8:1331-45.
91. Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* **1999**; 274:36369-72.
92. Aktories K, Barbieri JT. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nature Reviews Microbiology* **2005**; 3:397-410.
93. Wurtele M, Wolf E, Pederson KJ, et al. How the *Pseudomonas aeruginosa* ExoS toxin downregulates Rac. *Nat Struct Biol* **2001**; 8:23-6.
94. Sun J, Barbieri JT. ExoS Rho GTPase-activating protein activity stimulates reorganization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase guanine nucleotide disassociation inhibitor. *The Journal of biological chemistry* **2004**; 279:42936-44.
95. Wurtele M, Renault L, Barbieri JT, Wittinghofer A, Wolf E. Structure of the ExoS GTPase activating domain. *FEBS Lett* **2001**; 491:26-9.
96. Rocha CL, Rucks EA, Vincent DM, Olson JC. Examination of the coordinate effects of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS on Rac1. *Infect Immun* **2005**; 73:5458-67.
97. Frithz-Lindsten E, Du Y, Rosqvist R, Forsberg A. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis

resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Mol Microbiol* **1997**; 25:1125-39.

98. Henriksson ML, Troller U, Hallberg B. 14-3-3 proteins are required for the inhibition of Ras by exoenzyme S. *Biochem J* **2000**; 349 Pt 3:697-701.

99. Maresso AW, Deng Q, Pereckas MS, Wakim BT, Barbieri JT. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS ADP-ribosyltransferase inhibits ERM phosphorylation. *Cell Microbiol* **2007**; 9:97-105.

100. Fu H, Coburn J, Collier RJ. The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**; 90:2320-4.

101. Coburn J, Kane AV, Feig L, Gill DM. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S requires a eukaryotic protein for ADP-ribosyltransferase activity. *J Biol Chem* **1991**; 266:6438-46.

102. Zvibel I, Bar-Zohar D, Kloog Y, Oren R, Reif S. The effect of Ras inhibition on the proliferation, apoptosis and matrix metalloproteases activity in rat hepatic stellate cells. *Dig Dis Sci* **2008**; 53:1048-53.

103. Ganesan AK, Frank DW, Misra RP, Schmidt G, Barbieri JT. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites. *J Biol Chem* **1998**; 273:7332-7.

104. Ganesan AK, Vincent TS, Olson JC, Barbieri JT. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S disrupts Ras-mediated signal transduction by inhibiting guanine nucleotide exchange factor-catalyzed nucleotide exchange. *J Biol Chem* **1999**; 274:21823-9.

105. Henriksson ML, Rosqvist R, Telepnev M, Wolf-Watz H, Hallberg B. Ras effector pathway activation by epidermal growth factor is inhibited in vivo by exoenzyme S ADP-ribosylation of Ras. *The Biochemical journal* **2000**; 347:217-22.

106. Vincent TS, Fraylick JE, McGuffie EM, Olson JC. ADP-ribosylation of oncogenic Ras proteins by *pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S in vivo. *Mol Microbiol* **1999**; 32:1054-64.

107. Jansson AL, Yasmin L, Warne P, Downward J, Palmer RH, Hallberg B. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is not able to induce apoptosis when cells express activated proteins, such as Ras or protein kinase B/Akt. *Cell Microbiol* **2006**; 8:815-22.

108. Maresso AW, Baldwin MR, Barbieri JT. Ezrin/radixin/moesin proteins are high affinity targets for ADP-ribosylation by *Pseudomonas aeruginosa* ExoS. *The Journal of biological chemistry* **2004**; 279:38402-8.

109. Rangel SM, Logan LK, Hauser AR. The ADP-Ribosyltransferase Domain of the Effector Protein ExoS Inhibits Phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during Pneumonia. *mBio* **2014**; 5.

110. Epelman S, Bruno TF, Neely GG, Woods DE, Mody CH. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces transcriptional expression of proinflammatory cytokines and chemokines. *Infect Immun* **2000**; 68:4811-4.

111. Epelman S, Stack D, Bell C, et al. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **2004**; 173:2031-40.

112. Ichikawa JK, English SB, Wolfgang MC, Jackson R, Butte AJ, Lory S. Genome-wide analysis of host responses to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system yields synergistic effects. *Cell Microbiol* **2005**; 7:1635-46.

113. Jia J, Alaoui-El-Azher M, Chow M, Chambers TC, Baker H, Jin S. c-Jun NH2-terminal kinase-mediated signaling is essential for *Pseudomonas aeruginosa* ExoS-induced apoptosis. *Infect Immun* **2003**; 71:3361-70.

114. O'Grady EP, Mulcahy H, O'Callaghan J, Adams C, O'Gara F. *Pseudomonas aeruginosa* infection of airway epithelial cells modulates expression of Kruppel-like factors 2 and 6 via RsmA-mediated regulation of type III exoenzymes S and Y. *Infect Immun* **2006**; 74:5893-902.

115. SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, et al. KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *The Journal of experimental medicine* **2004**; 199:1305-15.
116. Das H, Kumar A, Lin Z, et al. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103:6653-8.
117. Kumar A, Lin Z, SenBanerjee S, Jain MK. Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases. *Mol Cell Biol* **2005**; 25:5893-903.
118. Saavedra MT, Patterson AD, West J, et al. Abrogation of anti-inflammatory transcription factor LKLF in neutrophil-dominated airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2008**; 38:679-88.
119. Dach K, Zovko J, Hogardt M, et al. Bacterial toxins induce sustained mRNA expression of the silencing transcription factor klf2 via inactivation of RhoA and RhoGDI 1. *Infect Immun* **2009**; 77:5583-92.
120. Barbieri JT, Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology **2004**; 152:79-92.
121. Kazmierczak BI, Engel JN. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT acts in vivo as a GTPase-activating protein for RhoA, Rac1, and Cdc42. *Infect Immun* **2002**; 70:2198-205.
122. Krall R, Schmidt G, Aktories K, Barbieri JT. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect Immun* **2000**; 68:6066-8.
123. Shafikhani SH, Morales C, Engel J. The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. *Cell Microbiol* **2008**; 10:994-1007.
124. Sun Y, Karmakar M, Taylor PR, Rietsch A, Pearlman E. ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *The Journal of Immunology* **2012**; 188:1884-95.
125. Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* **2004**; 72:6969-77.
126. Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**; 95:13899-904.
127. Sayner SL, Alexeyev M, Dessauer CW, Stevens T. Soluble adenylyl cyclase reveals the significance of cAMP compartmentation on pulmonary microvascular endothelial cell barrier. *Circ Res* **2006**; 98:675-81.
128. Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J, Stevens T. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res* **2004**; 95:196-203.
129. Cowell BA, Evans DJ, Fleiszig SM. Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol Lett* **2005**; 250:71-6.
130. Lee VT, Smith RS, Tummler B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* **2005**; 73:1695-705.
131. Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun* **2005**; 73:1706-13.
132. Sato H, Frank DW, Hillard CJ, et al. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* **2003**; 22:2959-69.
133. Phillips RM, Six DA, Dennis EA, Ghosh P. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* **2003**; 278:41326-32.

134. Anderson DM, Schmalzer KM, Sato H, et al. Ubiquitin and ubiquitin-modified proteins activate the *Pseudomonas aeruginosa* T3SS cytotoxin, ExoU. *Mol Microbiol* **2011**; 82:1454-67.
135. Tyson GH, Hauser AR. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Is a Novel Coactivator of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU. *Infect Immun* **2013**; 81:2873-81.
136. Howell HA, Logan LK, Hauser AR. Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *mBio* **2013**; 4:e00032-13.
137. McMorran B, Town L, Costelloe E, et al. Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect Immun* **2003**; 71:6035-44.
138. Chitkara YK, Feierabend TC. Endogenous and exogenous infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a burns unit. *Int Surg* **1981**; 66:237-40.
139. Matar GM, Harakeh HS, Ramlawi F, Khneisser I, Hadi U. Comparative analysis between *Pseudomonas aeruginosa* genotypes and severity of symptoms in patients with unilateral or bilateral otitis externa. *Curr Microbiol* **2001**; 42:190-3.
140. Crouch Brewer S, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV, Jr. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* **1996**; 109:1019-29.
141. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **2000**; 2:1051-60.
142. Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* **2008**; 35:124-34.
143. Winstanley C, Fothergill JL. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett* **2009**; 290:1-9.
144. de Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* **2009**; 11:279-88.
145. Schaber JA, Hammond A, Carty NL, et al. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* **2007**; 56:738-48.
146. Sakuragi Y, Kolter R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **2007**; 189:5383-6.
147. Yang L, Haagensen JA, Jelsbak L, et al. In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J Bacteriol* **2008**; 190:2767-76.
148. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **1999**; 284:1318-22.
149. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* **2008**; 10:2331-43.
150. Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LA, Davies DG, Gilbert P. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* **2004**; 186:7312-26.
151. Pritt B, O'Brien L, Winn W. Mucoid *Pseudomonas* in cystic fibrosis. *Am J Clin Pathol* **2007**; 128:32-4.
152. Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, et al. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100:7907-12.
153. Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Govan JR, Holloway BW, Deretic V. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**; 90:8377-81.

154. Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun* **1997**; 65:3838-46.
155. Bazire A, Shioya K, Soum-Souter E, et al. The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **2010**; 192:3001-10.
156. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* **2012**; 10:841-51.
157. Bals R, Weiner DJ, Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* **1999**; 103:303-7.
158. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* **2013**; 13:453-60.
159. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* **2008**; 118:3546-56.
160. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* **2012**; 18:673-83.
161. Ito T, Yang M, Wang YH, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* **2007**; 204:105-15.
162. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* **2002**; 109:571-7.
163. Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* **2004**; 2:727-38.
164. Zhang Z, Louboutin JP, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infect Immun* **2005**; 73:7151-60.
165. Jaworska J, Coulombe F, Downey J, et al. NLRX1 prevents mitochondrial induced apoptosis and enhances macrophage antiviral immunity by interacting with influenza virus PB1-F2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**; 111:E2110-9.
166. Baxt LA, Garza-Mayers AC, Goldberg MB. Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Science* **2013**; 340:697-701.
167. Powell WS. Eicosanoids and the lungs. *Physiol Basis Resp Dis* **2005**; Chapter 43.
168. Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, Jr., Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents* **2003**; 22:465-78.
169. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* **2000**; 8:402-10.
170. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **2006**; 124:783-801.
171. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* **2006**; 7:1250-7.
172. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* **2014**; 14:9-23.
173. Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**; 94:14614-9.
174. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **1997**; 388:394-7.
175. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* **2011**; 32:157-64.
176. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* **2006**; 13:816-25.

177. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **2011**; 34:637-50.
178. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **2001**; 410:1099-103.
179. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* **2006**; 6:9-20.
180. Park JH, Kim YG, McDonald C, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* **2007**; 178:2380-6.
181. Legrand-Poels S, Kustermans G, Bex F, Kremmer E, Kufer TA, Piette J. Modulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **2007**; 120:1299-310.
182. Pang IK, Iwasaki A. Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. *Trends Immunol* **2011**; 32:34-41.
183. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology* **2009**; 9:465-79.
184. Saito T, Gale M, Jr. Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. *J Exp Med* **2008**; 205:1523-7.
185. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, et al. Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. *Science* **2013**.
186. Gegner JA, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J Biol Chem* **1995**; 270:5320-5.
187. Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* **2000**; 165:3541-4.
188. Huang X, Du W, McClellan SA, Barrett RP, Hazlett LD. TLR4 is required for host resistance in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2006**; 47:4910-6.
189. Sun Y, Karmakar M, Roy S, et al. TLR4 and TLR5 on corneal macrophages regulate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by signaling through MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol* **2010**; 185:4272-83.
190. Skerrett SJ, Wilson CB, Liggitt HD, Hajjar AM. Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **2007**; 292:L312-22.
191. Ramphal R, Balloy V, Jyot J, Verma A, Si-Tahar M, Chignard M. Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **2008**; 181:586-92.
192. Raoust E, Balloy V, Garcia-Verdugo I, Touqui L, Ramphal R, Chignard M. *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS One* **2009**; 4:e7259.
193. Zhao K, Deng X, He C, Yue B, Wu M. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles modulate host immune responses by targeting the Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Infect Immun* **2013**; 81:4509-18.
194. Gupta SK, Berk RS, Masinick S, Hazlett LD. Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* **1994**; 62:4572-9.
195. Bezzerri V, Borgatti M, Finotti A, Tamanini A, Gambari R, Cabrini G. Mapping the transcriptional machinery of the IL-8 gene in human bronchial epithelial cells. *The Journal of Immunology* **2011**; 187:6069-81.
196. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2004**; 30:627-34.

197. Erridge C, Pridmore A, Eley A, Stewart J, Poxton IR. Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. *J Med Microbiol* **2004**; 53:735-40.
198. Pene F, Grimaldi D, Zuber B, et al. Toll-like receptor 2 deficiency increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the setting of sepsis-induced immune dysfunction. *J Infect Dis* **2012**; 206:932-42.
199. Beaudoin T, Lafayette S, Nguyen D, Rousseau S. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* caused by *mucA* mutations result in activation of TLR2 in addition to TLR5 in airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2012**; 428:150-4.
200. Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* **2003**; 4:1247-53.
201. Morris AE, Liggitt HD, Hawn TR, Skerrett SJ. Role of Toll-like receptor 5 in the innate immune response to acute *P. aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2009**; 297:L1112-9.
202. Balloy V, Verma A, Kuravi S, Si-Tahar M, Chignard M, Ramphal R. The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **2007**; 196:289-96.
203. Ben Mohamed F, Garcia-Verdugo I, Medina M, et al. A crucial role of Flagellin in the induction of airway mucus production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **2012**; 7:e39888.
204. Beaudoin T, LaFayette S, Roussel L, et al. The level of p38alpha mitogen-activated protein kinase activation in airway epithelial cells determines the onset of innate immune responses to planktonic and biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **2013**; 207:1544-55.
205. Descamps D, Le Gars M, Balloy V, et al. Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1beta secretion, and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**; 109:1619-24.
206. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **2000**; 408:740-5.
207. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **2003**; 198:513-20.
208. Delgado MA, Poschet JF, Deretic V. Nonclassical pathway of *Pseudomonas aeruginosa* DNA-induced interleukin-8 secretion in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Infect Immun* **2006**; 74:2975-84.
209. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **1989**; 245:1073-80.
210. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **1989**; 245:1066-73.
211. Gadsby DC, Vergani P, Csanady L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **2006**; 440:477-83.
212. Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* **2005**; 433:876-80.
213. Vergani P, Basso C, Mense M, Nairn AC, Gadsby DC. Control of the CFTR channel's gates. *Biochem Soc Trans* **2005**; 33:1003-7.
214. Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* **1991**; 67:775-84.

215. Gadsby DC, Nairn AC. Regulation of CFTR Cl⁻ ion channels by phosphorylation and dephosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **1999**; 33:79-106.
216. Gadsby DC, Nairn AC. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev* **1999**; 79:S77-S107.
217. Picciorotto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greengard P, Nairn AC. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **1992**; 267:12742-52.
218. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **1990**; 63:827-34.
219. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* **2002**; 19:575-606.
220. Kreindler JL. Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol Ther* **2010**; 125:219-29.
221. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* **1998**; 95:1005-15.
222. Boucher RC. Relationship of airway epithelial ion transport to chronic bronchitis. *Proceedings of the American Thoracic Society* **2004**; 1:66-70.
223. Döring G, Gulbins E. Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cell Microbiol* **2009**; 11:208-16.
224. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **1996**; 85:229-36.
225. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* **2012**; 487:109-13.
226. Machen TE. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? *American journal of physiology Cell physiology* **2006**; 291:C218-30.
227. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **1995**; 151:1075-82.
228. Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, et al. Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **2001**; 32:356-66.
229. Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS One* **2009**; 4:e4664.
230. Hampton TH, Ballok AE, Bomberger JM, et al. Does the F508-CFTR mutation induce a proinflammatory response in human airway epithelial cells? *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **2012**; 303:L509-18.
231. Berube J, Roussel L, Nattagh L, Rousseau S. Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* **2010**; 285:22299-307.
232. Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, et al. Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2000**; 23:121-7.
233. Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, et al. Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. *Biochem Pharmacol* **2007**; 73:1982-94.
234. Bhattacharyya S, Gutti U, Mercado J, Moore C, Pollard HB, Biswas R. MAPK signaling pathways regulate IL-8 mRNA stability and IL-8 protein expression in cystic fibrosis lung epithelial cell lines. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **2011**; 300:L81-7.
235. Matsui H, Verghese MW, Kesimer M, et al. Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **2005**; 175:1090-9.

236. Di A, Brown ME, Deriy LV, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* **2006**; 8:933-44.
237. McKeon DJ, Cadwallader KA, Idris S, et al. Cystic fibrosis neutrophils have normal intrinsic reactive oxygen species generation. *Eur Respir J* **2010**; 35:1264-72.
238. Bartling TR, Drumm ML. Oxidative stress causes IL8 promoter hyperacetylation in cystic fibrosis airway cell models. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2009**; 40:58-65.
239. Luciani A, Villella VR, Esposito S, et al. Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* **2010**; 12:863-75.
240. Blohmke CJ, Victor RE, Hirschfeld AF, et al. Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) **2008**; 180:7764-73.
241. John G, Yildirim AO, Rubin BK, Gruenert DC, Henke MO. TLR-4-mediated innate immunity is reduced in cystic fibrosis airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2010**; 42:424-31.
242. Fothergill JL, Mowat E, Ledson MJ, Walshaw MJ, Winstanley C. Fluctuations in phenotypes and genotypes within populations of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung during pulmonary exacerbations. *J Med Microbiol* **2010**; 59:472-81.
243. Hansen SK, Rau MH, Johansen HK, et al. Evolution and diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in the paranasal sinuses of cystic fibrosis children have implications for chronic lung infection. *The ISME journal* **2012**; 6:31-45.
244. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **1999**; 145 (Pt 6):1349-57.
245. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **2002**; 416:740-3.
246. Limoli DH, Rockel AB, Host KM, et al. Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. *PLoS Pathog* **2014**; 10:e1004083.
247. Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* **2008**; 77:495-520.
248. Murakami M, Taketomi Y, Sato H, Yamamoto K. Secreted phospholipase A2 revisited. *J Biochem* **2011**; 150:233-55.
249. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* **2010**; 10:181-93.
250. Wu YZ, Abolhassani M, Ollero M, et al. Cytosolic phospholipase A2 α mediates *Pseudomonas aeruginosa* LPS-induced airway constriction of CFTR $-/-$ mice. *Respir Res* **2010**; 11:49.
251. Coulombe F, Jaworska J, Verway M, et al. Targeted Prostaglandin E2 Inhibition Enhances Antiviral Immunity through Induction of Type I Interferon and Apoptosis in Macrophages. *Immunity* **2014**; 40:554-68.
252. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**; 31:986-1000.
253. Harizi H, Gualde N. Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. *Cell Mol Immunol* **2006**; 3:271-7.
254. Henderson WR, Jr., Chi EY, Bollinger JG, et al. Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med* **2007**; 204:865-77.
255. Mancuso P, Lewis C, Serezani CH, Goel D, Peters-Golden M. Intrapulmonary administration of leukotriene B4 enhances pulmonary host defense against pneumococcal pneumonia. *Infect Immun* **2010**; 78:2264-71.

256. Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* **2011**; 50:152-92.
257. Arbibe L, Vial D, Rosinski-Chupin I, et al. Endotoxin induces expression of type II phospholipase A2 in macrophages during acute lung injury in guinea pigs: involvement of TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced type II phospholipase A2 synthesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **1997**; 159:391-400.
258. Eerola LI, Surrel F, Nevalainen TJ, Gelb MH, Lambeau G, Laine VJO. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim Biophys Acta* **2006**; 1761:745-56.
259. Giannattasio G, Fujioka D, Xing W, Katz HR, Boyce JA, Balestrieri B. Group V secretory phospholipase A2 reveals its role in house dust mite-induced allergic pulmonary inflammation by regulation of dendritic cell function. *J Immunol* **2010**; 185:4430-8.
260. Balestrieri B, Maekawa A, Xing W, Gelb MH, Katz HR, Arm JP. Group V secretory phospholipase A2 modulates phagosome maturation and regulates the innate immune response against *Candida albicans*. *J Immunol* **2009**; 182:4891-8.
261. Degousee N, Kelvin DJ, Geisslinger G, et al. Group V phospholipase A2 in bone marrow-derived myeloid cells and bronchial epithelial cells promotes bacterial clearance after *Escherichia coli* pneumonia. *The Journal of biological chemistry* **2011**; 286:35650-62.
262. Ohtsuki M, Taketomi Y, Arata S, et al. Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A2 in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J Biol Chem* **2006**; 281:36420-33.
263. Murakami M, Kudo I, Inoue K. Molecular nature of phospholipases A2 involved in prostaglandin I2 synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Possible participation of cytosolic and extracellular type II phospholipases A2. *The Journal of biological chemistry* **1993**; 268:839-44.
264. Nakos G, Kitsioulis E, Hatzidaki E, Koulouras V, Touqui L, Lekka ME. Phospholipases A2 and platelet-activating-factor acetylhydrolase in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* **2005**; 33:772-9.
265. Koduri RS, Grönroos JO, Laine VJO, et al. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *The Journal of biological chemistry* **2002**; 277:5849-57.
266. Gronroos JO, Laine VJ, Janssen MJ, Egmond MR, Nevalainen TJ. Bactericidal properties of group IIA and group V phospholipases A2. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **2001**; 166:4029-34.
267. Bezzine S, Bollinger JG, Singer AG, Veatch SL, Keller SL, Gelb MH. On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A2 for membranes with anionic phospholipids. *The Journal of biological chemistry* **2002**; 277:48523-34.
268. Koprivnjak T, Peschel A, Gelb MH, Liang NS, Weiss JP. Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *The Journal of biological chemistry* **2002**; 277:47636-44.
269. Beers SA, Buckland AG, Koduri RS, Cho W, Gelb MH, Wilton DC. The antibacterial properties of secreted phospholipases A2: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall. *The Journal of biological chemistry* **2002**; 277:1788-93.
270. Green JA, Smith GM, Buchta R, et al. Circulating phospholipase A2 activity associated with sepsis and septic shock is indistinguishable from that associated with rheumatoid arthritis. *Inflammation* **1991**; 15:355-67.
271. Keuter M, Dharmana E, Kullberg BJ, et al. Phospholipase A2 is a circulating mediator in typhoid fever. *J Infect Dis* **1995**; 172:305-8.

272. Grönroos JO, Laine VJO, Nevalainen TJ. Bactericidal group IIA phospholipase A2 in serum of patients with bacterial infections. *The Journal of infectious diseases* **2002**; 185:1767-72.
273. Pruzanski W, Vadas P, Stefanski E, Urowitz MB. Phospholipase A2 activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Its possible role as a proinflammatory enzyme. *J Rheumatol* **1985**; 12:211-6.
274. Puolakkainen P, Valtonen V, Paananen A, Schroder T. C-reactive protein (CRP) and serum phospholipase A2 in the assessment of the severity of acute pancreatitis. *Gut* **1987**; 28:764-71.
275. Crowl RM, Stoller TJ, Conroy RR, Stoner CR. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J Biol Chem* **1991**; 266:2647-51.
276. Weiss J, Inada M, Elsbach P, Crowl RM. Structural determinants of the action against *Escherichia coli* of a human inflammatory fluid phospholipase A2 in concert with polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of biological chemistry* **1994**; 269:26331-7.
277. Weinrauch Y, Abad C, Liang NS, Lowry SF, Weiss J. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group IIA phospholipase A2. *J Clin Invest* **1998**; 102:633-8.
278. Foreman-Wykert AK, Weinrauch Y, Elsbach P, Weiss J. Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria. *J Clin Invest* **1999**; 103:715-21.
279. Gronroos JO, Salonen JH, Viander M, Nevalainen TJ, Laine VJ. Roles of group IIA phospholipase A2 and complement in killing of bacteria by acute phase serum. *Scand J Immunol* **2005**; 62:413-9.
280. Qu XD, Lehrer RI. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* **1998**; 66:2791-7.
281. Mover E, Wu Y, Lambeau G, Touqui L, Areschoug T. A Novel Bacterial Resistance Mechanism against Human Group IIA-Secreted Phospholipase A2: Role of *Streptococcus pyogenes* Sortase A. *The Journal of Immunology* **2011**; 187:6437-46.
282. Gimenez AP, Wu Y-Z, Payá M, Delclaux C, Touqui L, Goossens PL. High bactericidal efficiency of type iia phospholipase A2 against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **2004**; 173:521-30.
283. Dubouix A, Campanac C, Fauvel J, et al. Bactericidal properties of group Iia secreted phospholipase A(2) against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Med Microbiol* **2003**; 52:1039-45.
284. Weiss J, Wright G, Bekkers AC, van den Bergh CJ, Verheij HM. Conversion of pig pancreas phospholipase A2 by protein engineering into enzyme active against *Escherichia coli* treated with the bactericidal/permeability-increasing protein. *The Journal of biological chemistry* **1991**; 266:4162-7.
285. Attalah HL, Wu Y, Alaoui-El-Azher M, et al. Induction of type-IIA secretory phospholipase A2 in animal models of acute lung injury. *The European respiratory journal* **2003**; 21:1040-5.
286. Kennedy BP, Payette P, Mudgett J, et al. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *The Journal of biological chemistry* **1995**; 270:22378-85.
287. Grass DS, Felkner RH, Chiang MY, et al. Expression of human group II PLA2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *J Clin Invest* **1996**; 97:2233-41.

288. Laine VJ, Grass DS, Nevalainen TJ. Protection by group II phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) **1999**; 162:7402-8.
289. Piris-Gimenez A, PayÃ M, Lambeau G, et al. In vivo protective role of human group IIA phospholipase A2 against experimental anthrax. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) **2005**; 175:6786-91.
290. Andreani M, Olivier JL, Berenbaum F, Raymondjean M, Bereziat G. Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases A(2). *Biochim Biophys Acta* **2000**; 1488:149-58.
291. Jensen MD, Sheng W, Simonyi A, Johnson GS, Sun AY, Sun GY. Involvement of oxidative pathways in cytokine-induced secretory phospholipase A2-IIA in astrocytes. *Neurochem Int* **2009**; 55:362-8.
292. Antonio V, Brouillet A, Janvier B, et al. Transcriptional regulation of the rat type IIA phospholipase A2 gene by cAMP and interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells: interplay of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), nuclear factor-kappaB and Ets transcription factors. *The Biochemical journal* **2002**; 368:415-24.
293. Menschikowski M, Hagelgans A, Gussakovsky E, Kostka H, Paley EL, Siegert G. Differential expression of secretory phospholipases A2 in normal and malignant prostate cell lines: regulation by cytokines, cell signaling pathways, and epigenetic mechanisms. *Neoplasia* (New York, NY) **2008**; 10:279-86.
294. Menschikowski M, Hagelgans A, Kostka H, Eisenhofer G, Siegert G. Involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of secreted phospholipase A2 expressions in Jurkat leukemia cells. *Neoplasia* (New York, NY) **2008**; 10:1195-203.
295. Pfeilschifter J, Pignat W, Marki F, Wiesenberger I. Release of phospholipase A2 activity from rat vascular smooth muscle cells mediated by cAMP. *Eur J Biochem* **1989**; 181:237-42.
296. Vial D, Arbibe L, Havet N, Dumarey C, Vargaftig B, Touqui L. Down-regulation by prostaglandins of type-II phospholipase A2 expression in guinea-pig alveolar macrophages: a possible involvement of cAMP. *The Biochemical journal* **1998**; 330 (Pt 1):89-94.
297. Alaoui-El-Azher M, Wu Y, Havet N, Israel A, Lilienbaum A, Touqui L. Arachidonic acid differentially affects basal and lipopolysaccharide-induced sPLA(2)-IIA expression in alveolar macrophages through NF-kappaB and PPAR-gamma-dependent pathways. *Mol Pharmacol* **2002**; 61:786-94.
298. Touqui L, PayÃ M, Thouron F, et al. *Neisseria meningitidis* pili induce type-IIA phospholipase A2 expression in alveolar macrophages. *FEBS Lett* **2005**; 579:4923-7.
299. Raymond B, Leduc D, Ravaux L, et al. Edema toxin impairs anthracidal phospholipase A2 expression by alveolar macrophages. *PLoS Pathog* **2007**; 3:e187.
300. Medjane S, Raymond B, Wu Y, Touqui L. Impact of CFTR DeltaF508 mutation on prostaglandin E2 production and type IIA phospholipase A2 expression by pulmonary epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **2005**; 289:L816-24.
301. Giannattasio G, Lai Y, Granata F, et al. Expression of phospholipases A2 in primary human lung macrophages: role of cytosolic phospholipase A2-alpha in arachidonic acid release and platelet activating factor synthesis. *Biochim Biophys Acta* **2009**; 1791:92-102.
302. Raymond B, Ravaux L, M  met S, et al. Anthrax lethal toxin down-regulates type-IIA secreted phospholipase A(2) expression through MAPK/NF-kappaB inactivation. *Biochem Pharmacol* **2010**; 79:1149-55.
303. Doring G, Conway SP, Heijerman HG, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* **2000**; 16:749-67.
304. Goss CH, Muhlebach MS. Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **2011**; 10:298-306.

305. Coin D, Louis D, Bernillon J, Guinand M, Wallach J. LasA, alkaline protease and elastase in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: quantification by immunochemical methods. *FEMS Immunol Med Microbiol* **1997**; 18:175-84.
306. Yang L, Liu Y, Markussen T, Hoiby N, Tolker-Nielsen T, Molin S. Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2011**; 62:339-47.
307. Rosenthal MD, Gordon MN, Buescher ES, Slusser JH, Harris LK, Franson RC. Human neutrophils store type II 14-kDa phospholipase A2 in granules and secrete active enzyme in response to soluble stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**; 208:650-6.
308. Kreda SM, Davis CW, Rose MC. CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**; 2:a009589.
309. Dasgupta N, Ashare A, Hunninghake GW, Yahr TL. Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca²⁺ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect Immun* **2006**; 74:3334-41.
310. Zahlten J, Steinicke R, Opitz B, et al. TLR2- and nucleotide-binding oligomerization domain 2-dependent Kruppel-like factor 2 expression downregulates NF-kappa B-related gene expression. *The Journal of Immunology* **2010**; 185:597-604.
311. Jia J, Wang Y, Zhou L, Jin S. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoS effectively induces apoptosis in host cells. *Infect Immun* **2006**; 74:6557-70.
312. van Thienen JV, Fledderus JO, Dekker RJ, et al. Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovasc Res* **2006**; 72:231-40.
313. Okuda J, Hayashi N, Tanabe S, Minagawa S, Gotoh N. Degradation of interleukin 8 by the serine protease MucD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* **2011**; 17:782-92.
314. Balloy V, Sallenave JM, Wu Y, et al. *Aspergillus fumigatus*-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway. *J Biol Chem* **2008**; 283:30513-21.
315. Dacheux D, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, Attree I. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* **2000**; 68:2916-24.
316. Horsman SR, Moore RA, Lewenza S. Calcium chelation by alginate activates the type III secretion system in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One* **2012**; 7:e46826.
317. Oslund RC, Gelb MH. Biochemical characterization of selective inhibitors of human group IIA secreted phospholipase A(2) and hyaluronic acid-linked inhibitor conjugates. *Biochemistry* **2012**; 51:8617-26.
318. Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock RE, Falla TJ. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:2921-7.
319. Madsen LM, Inada M, Weiss J. Determinants of activation by complement of group II phospholipase A2 acting against *Escherichia coli*. *Infect Immun* **1996**; 64:2425-30.
320. Koprivnjak T, Weidenmaier C, Peschel A, Weiss JP. Wall teichoic acid deficiency in *Staphylococcus aureus* confers selective resistance to mammalian group IIA phospholipase A(2) and human beta-defensin 3. *Infect Immun* **2008**; 76:2169-76.
321. Raymond B, Batsche E, Boutillon F, et al. Anthrax lethal toxin impairs IL-8 expression in epithelial cells through inhibition of histone H3 modification. *PLoS Pathog* **2009**; 5:e1000359.

322. Moreilhon C, Gras D, Hologne C, et al. Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiological genomics* **2005**; 20:244-55.
323. Thammavongsa V, Kern JW, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses. *J Exp Med* **2009**; 206:2417-27.
324. Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas DM. Enzymatic properties of *Staphylococcus aureus* adenosine synthase (AdsA). *BMC Biochem* **2011**; 12:56.
325. Miller LS, Cho JS. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat Rev Immunol* **2011**; 11:505-18.
326. Michelsen KS, Aicher A, Mohaupt M, et al. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *The Journal of biological chemistry* **2001**; 276:25680-6.
327. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* **2000**; 165:5392-6.
328. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **2003**; 278:8869-72.
329. Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, et al. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO reports* **2004**; 5:1000-6.
330. Koroskenyi K, Duro E, Pallai A, et al. Involvement of adenosine A2A receptors in engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation. *J Immunol* **2011**; 186:7144-55.
331. Belikoff BG, Hatfield S, Georgiev P, et al. A2B adenosine receptor blockade enhances macrophage-mediated bacterial phagocytosis and improves polymicrobial sepsis survival in mice. *J Immunol* **2011**; 186:2444-53.
332. Aronoff DM, Canetti C, Serezani CH, Luo M, Peters-Golden M. Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J Immunol* **2005**; 174:595-9.
333. Boyd AP, Ross PJ, Conroy H, Mahon N, Lavelle EC, Mills KH. Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death. *J Immunol* **2005**; 175:730-8.
334. Yeager LA, Chopra AK, Peterson JW. *Bacillus anthracis* edema toxin suppresses human macrophage phagocytosis and cytoskeletal remodeling via the protein kinase A and exchange protein activated by cyclic AMP pathways. *Infect Immun* **2009**; 77:2530-43.
335. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors-an update. *Pharmacol Rev* **2011**; 63:1-34.
336. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* **2001**; 414:916-20.
337. Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol* **2013**; 4:85.
338. Takahashi N, Tetsuka T, Uranishi H, Okamoto T. Inhibition of the NF- κ B transcriptional activity by protein kinase A. *Eur J Biochem* **2002**; 269:4559-65.
339. Lee H, Rezai-Zadeh N, Seto E. Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol Cell Biol* **2004**; 24:765-73.
340. Li Y, Wang W, Parker W, Clancy JP. Adenosine regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through prostenoids in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2006**; 34:600-8.

RESUME

La phospholipase A2 sécrétée de type IIA (sPLA2-IIA) est une protéine cationique de faible poids moléculaire dotée d'une puissante activité antibactérienne. La sPLA2-IIA possède la particularité de présenter une affinité plus élevée pour les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif. Le rôle physiopathologique de cette sélectivité d'action reste cependant méconnu. La mucoviscidose (MV) est une maladie génétique héréditaire, résultant de la mutation du canal transmembranaire CFTR. L'altération de la fonction du CFTR dans les poumons entraîne un épaissement du mucus et diminue la clairance muco-ciliaire. Cet environnement représente une niche idéale pour la colonisation par des pathogènes (bactéries, virus, champignons). Dans ce contexte, les deux pathogènes bactériens les plus retrouvés, *S. aureus* et *P. aeruginosa*, colonisent les voies aériennes de manière séquentielle: *S. aureus* est principalement retrouvé chez les jeunes patients et *P. aeruginosa* chez les adultes et est associé à une dégradation de la fonction respiratoire. Les mécanismes impliqués dans ce changement de prévalence restent cependant mal connus.

Dans ce travail, nous démontrons que la sPLA2-IIA, de part sa sélectivité contre les bactéries à Gram positif, participe à ce phénomène. L'expression de la sPLA2-IIA est plus importante dans les poumons de patients MV que dans les poumons de patients non MV et augmente avec l'âge des patients. La sPLA2-IIA présente dans les expectorations de patients MV est active et capable d'éliminer spécifiquement *S. aureus*. L'utilisation de souris transgéniques surexprimant la sPLA2-IIA humaine a permis de valider sa spécificité envers *S. aureus in vivo*. Nous avons également utilisé le modèle cobaye afin de démontrer l'induction de l'expression de la sPLA2-IIA endogène par *P. aeruginosa* et sa participation à l'élimination de *S. aureus* des voies respiratoires. Enfin, nous avons identifié les cellules épithéliales comme une source importante de sPLA2-IIA chez les patients MV. Dans ces cellules, *P. aeruginosa* induit l'expression de la sPLA2-IIA par un mécanisme dépendant de l'injection de la toxine ExoS. Cette toxine active en retour le facteur de transcription KLF2, régulateur de l'expression de la sPLA2-IIA.

L'ensemble de ces résultats suggère que la sPLA2-IIA induite par *P. aeruginosa*, participe à l'élimination de *S. aureus* dans les voies aériennes des patients MV. Bien que d'autres mécanismes puissent être impliqués, nous mettons en évidence un nouveau mécanisme dans lequel une bactérie élimine une autre bactérie en manipulant le système immunitaire de l'hôte.

Mots clés: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, phospholipase A2 sécrétée, mucoviscidose, cellules épithéliales.